



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Universidad Nacional de Rosario

Tesis de Doctorado

**Biosíntesis de ácido lipoico y proteínas lipoiladas
en tripanosomátidos**

Presentada por Lic. Daniel Andrés Lambruschi

Rosario, Argentina

2017

Biosíntesis de ácido lipoico y proteínas lipoiladas en tripanosomátidos

Daniel Andrés Lambruschi

Licenciado en Biotecnología

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar por el grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones originales llevadas a cabo en el Laboratorio de Protozoología Molecular, Departamento de Microbiología, del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET), dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre los meses de mayo de 2011 y febrero de 2017, bajo la dirección del Doctor Antonio Domingo Uttaro.

Parte de los resultados obtenidos en esta tesis han sido presentados en:

1. "Characterization of a putative octanoyl transferase for lipoate biosynthesis in Trypanosomatids". Lambruschi D, Uttaro AD. XLVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Mendoza. 29 de octubre-1 de noviembre de 2012.
2. "*Trypanosoma cruzi* would not be able to scavenging lipoic acid". Lambruschi D, Uttaro AD. XXVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología (SAP), Rosario, Santa Fe. 24-25 de octubre de 2013.
3. "The origin of metazoan lipoate metabolism could be traced back to holozoan protists". Montecchiarini M, Lambruschi D, Uttaro AD. L Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Rosario, Santa Fe. 11-14 de noviembre de 2014.
4. "*Trypanosoma cruzi* protein lipoilation pattern is modified by the lipoate biosynthesis/salvage inhibitor 8-bromo-octanoate and its methyl derivative". Paola Vacchina, Daniel A. Lambruschi y Antonio D. Uttaro. XXVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología (SAP), Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 15-17 de noviembre de 2015.

A mis viejos

A mis amigos

A Flor

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar al Dr. Antonio Uttaro (Toni) por haberme dado la oportunidad de trabajar con él y ser parte de su grupo. Por haber confiado en mí pese a no tener el perfil profesional que habitualmente este tipo de investigaciones requiere; por la paciencia y la buena predisposición que conlleva –y que él siempre demostró- dirigir a un doctorando con esta particularidad. Por enseñarme, guiarme, estar en los momentos difíciles y hasta el final de este camino.

En segundo lugar quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio. Sin su apoyo y amistad sinceramente no lo hubiera logrado. A Allo, Seba, Pao y Kari, que me recibieron con los brazos abiertos, me integraron al grupo inmediatamente y me hicieron sentir como si siempre hubiera sido parte de él. Fue un momento de adaptación muy difícil para mí y el haberlo superado se lo debo en gran parte a ellos. Agradezco infinitamente también a los que fueron sumándose luego, Meli, Cele y finalmente Vero (que en realidad volvía); y a los que conformaron la segunda (desde mi perspectiva) generación de “Uttaros”: Jofi, Vane, Nico, Mari (unos meses) y Ale. Quedan miles de momentos compartidos, tanto alegres como tristes, anécdotas, frases (muchas plasmadas e immortalizadas en papel), mates, cervezas.

Tampoco quiero dejar de agradecer a los “Maranos”, con quienes compartimos laboratorio en el nuevo IBR: Nadia, Roxi, Ale, Sabri, Manly, Ana, Facu, Luli. A Lola, una compañía frecuente y privilegiada en la sala de cultivo, y una de las personas más alegres y optimistas que he conocido. Y a todos los chicos del instituto, con quienes compartí muchas y variadas circunstancias; ayuda y orientación “técnica”, ideas, consejos, congresos, fulbitos, *after* labs. Es muy injusto no nombrar a todos y es muy injusto dejar de nombrar a algunos con quienes compartí un poquito más, por esas vueltas de la vida: Papa, Ber, Rober, Santi, Gasti. A Gasti en particular, quiero agradecerle, además de las charlas “pseudofilosóficas”, los paseos en bici y otras tantas cosas, el haber estado ahí en momentos clave; en ocasiones, literalmente críticos (vos entendés).

Quisiera agradecer a cada uno en particular por distintos motivos, pero tendría que escribir otra tesis sólo para eso. Y quedan tantas personas sin nombrar que no puedo evitar sentir cierto malestar.

Agradezo también a todos los directivos del IBR, a su actual director, Dr. Alejandro Vila y a su ex director, Dr. Diego de Mendoza, por permitirme trabajar en una institución tan importante. A todos los investigadores que de alguna u otra manera fueron parte. En especial, a la Dra. Cecilia Mansilla cuyos conocimientos y sugerencias fueron muy importantes; y también a la Dra. Pamela Cribb, que junto con su equipo me ayudó mucho en mis comienzos, cuando compartíamos espacio en Sala 9. A la Turca, por su preocupación. A Clau, Lilo, Vivi, Sil (¡siempre me acuerdo de sus tortas!). A todo el personal de apoyo. A los chicos de administración, en particular a Santi Cicotti, que ya no trabaja allí pero fue parte activa y

desinteresada de un momento trascendental en mi historia personal. Al Dr. Esteban Serra, decano de la Facultad; a los directivos y personal que fueron parte del camino. Al CONICET.

Quiero destacar y hacer un agradecimiento muy especial a la Dra. Verónica Livore (Vero) y a la Dra. Paola Vacchina (Pao) ya que sin sus aportes, en diferentes momentos de la tesis, tanto en aspectos teóricos, experimentales como personales no podría haberla terminado. En particular, la colaboración de Pao fue tan importante que bien debiera considerársela codirectora del trabajo.

Gracias a las Dras. Ana Arabolaza y Silvia López, quienes conformaron mi Comisión de Tesis; no sólo me alentaron en todo momento sino que confiaron de manera sincera en que sería capaz de lograr el objetivo. Al Dr. Eduardo Ceccarelli, por su apoyo y asesoramiento al momento de solicitar una prórroga de la beca. Al Dr. Rubén Vallejos y a la Dra. Fabiana Drincovich, que me vienen apoyando y ayudando desde la licenciatura.

Han sido varios años largos, y mucha gente fue parte de esto, en algún momento, de una u otra forma. Y seguramente olvidaré mencionar a alguien en estos agradecimientos (un *cliché*, pero muy cierto). Pido disculpas por las posibles omisiones pero la gratitud para con todos siempre estará.

Gracias a Nico Blanco y a Mauri Braia por su amistad y el apoyo moral constante. A Eduardo Pochettino. A mi primer grupo de trabajo, en Tucumán; personas me que enriquecieron mucho y gracias a las cuales tuve la oportunidad de acceder inicialmente a una beca de CONICET. A Charly, que siempre estuvo y está, pese a las distancias geográficas.

Gracias a mis amigos de toda la vida, que siempre estuvieron ahí para compartir mis angustias y alegrías en relación con la tesis; o, simplemente, por compartir la vida conmigo y hacerla así tan especial. Los socios del Club de la Serpiente: Cele, Chuk, Guille, Tincho L., Seba, Tata; y los que no son socios y que veo mucho menos: Tortu, Tincho M., Lea, Lucho. Y a los amigos que Flor me regaló.

Gracias a mi familia, especialmente a mis viejos, por tanto amor incondicional y por haber contribuido a que sea la persona que hoy soy. (Y vos sos parte, Chuchú :). Gracias a mi familia política, tan numerosa como afectuosa (¡y divertida!).

Gracias a los chicos que, durante el último año y medio, compartiendo horas en las aulas conmigo me renovaron una y otra vez –sin saberlo- las energías necesarias para poder culminar esta empresa.

Y gracias a Flor. Que me acompaña desde el primer día del primer año de la licenciatura; intentos de deserción, desierto, selva, mudanzas interprovinciales, casamiento y no sé cuántas cosas más de por medio. Por ser –como expresé en ocasión de mi tesina- la que se bancó todo lo malo y simultáneamente ser la primera en alegrarse con todo lo bueno, acaso más que yo. Por enseñarme tanto. Por ser una persona única. Por ser puro amor.

Índice

Abreviaturas y símbolos.....	i
Resumen.....	iii
1. Introducción general.....	1
1.1. Los tripanosomátidos	1
1.1.1. Generalidades de los tripanosomátidos	1
1.1.2. <i>Trypanosoma cruzi</i> y el Mal de Chagas	2
1.1.3. <i>Trypanosoma brucei</i> y la Enfermedad del sueño	4
1.1.4. Ciclos de vida.....	5
1.1.4.1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
1.1.4.2. <i>Trypanosoma brucei</i>	6
1.2. El ácido lipoico	8
1.2.1. Estructura y propiedades fisicoquímicas	8
1.2.2. Funciones	9
1.2.2.1. Ácido lipoico libre: principal agente antioxidante celular	9
2.2.2.1.2. Regeneración de antioxidantes endógenos.....	10
1.2.2.1.3. Acción quelante de metales de transición	10
1.2.2.4. Beneficios del ácido lipoico sobre afecciones humanas.....	11
1.2.2.2. Ácido lipoico unido a proteínas: cofactor enzimático	11
1.2.2.2.1. Complejos α -oxoácido deshidrogenasas	12
1.2.2.2.1. Complejo de clivaje de glicina	16
1.2.4. Mecanismos de lipoilación.....	17
1.2.4.1. Síntesis <i>de novo</i>	17
1.2.4.2. Rescate o salvataje de ácido lipoico exógeno.....	18
1.2.4.3. Principales modelos.....	19
1.2.5. Enzimas involucradas en la biosíntesis de ácido lipoico.....	24
1.2.5.1. Lipoato sintasa.....	24

1.2.5.2. Octanoiltransferasa.....	25
1.2.5.3. Lipoato proteína ligasa	26
1.2.5.4. Amidotransferasa	27
1.2.5.5. Lipoamidasa	27
1.2.6. Biosíntesis de ácido lipoico en tripanosomas.....	28
1.2.6.1. Conocimientos previos	28
1.2.6.2. Importancia como potencial blanco quimioterapéutico	29
2. Objetivos	31
2.1. Objetivos generales	31
2.2. Objetivos específicos.....	31
3. Materiales y Métodos	32
3.1. Cepas y plásmidos.....	32
3.2 Medios de cultivo	33
3.2.1. Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	33
3.2.2. Medios de cultivo para <i>S. cerevisiae</i>	34
3.2.3. Medios de cultivo para <i>T. cruzi</i>	35
3.3. Soluciones	35
3.4. Condiciones de crecimiento	37
3.4.1. Cultivos de <i>E. coli</i> en medio líquido	37
3.4.2. Cultivos de <i>S. cerevisiae</i> en medio líquido	37
3.4.3. Cultivos de <i>T. cruzi</i> en medio líquido	38
3.5. Análisis bioinformático	38
3.6. Amplificación de ADN por PCR	39
3.7. PCR de colonias en <i>E. coli</i>	40
3.8. PCR de colonias en <i>S. cerevisiae</i>	40
3.9. Electroforesis de ADN	40
3.10. Oligonucleótidos	40
3.11. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa.....	41
3.12. Clonado en pCR®-Blunt II-TOPO® vector (Invitrogen)	41

3.13. Clonado en vector pBluescript II KS (Stratagene)	41
3.14. Selección de clones transformantes de <i>E. coli</i>	42
3.15. Secuenciación y análisis de secuencias	42
3.16. Preparación de ADN plasmídico.....	42
3.17. Cuantificación de ADN.....	43
3.18. Digestión con enzimas de restricción.....	43
3.19. Ligación inserto-vector	43
3.20. Subclonado en vector p426 GPD	44
3.21. Preparación de bacterias y levaduras electrocompetentes.....	44
3.21.1. Preparación de bacterias electrocompetentes	44
3.21.2. Preparación de levaduras electrocompetentes	44
3.22. Transformación por electroporación	45
3.23. Transformación por método químico (TSS)	45
3.24. Reversión de fenotipo mutante de crecimiento deficiente en <i>S. cerevisiae</i>	45
3.26. Obtención de extractos proteicos totales de <i>E. coli</i>	46
3.27. Obtención de extractos proteicos mitocondriales de <i>S. cerevisiae</i>	46
3.28. Obtención de extractos proteicos totales de <i>T. cruzi</i>	47
3.29. Dosaje de proteínas	47
3.30. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	47
3.31. Inmunodetección de proteínas fijadas en membrana (western blot)	48
3.32.1. Electrotransferencia de proteínas	48
3.32.2. Inmunodetección de Proteínas Inmovilizadas en Membrana.....	48
3.33. Ensayos de inhibición de crecimiento en cultivos de <i>T. cruzi</i>	49
3.33.1. Ensayos de inhibición con 8-bromo-octanoato (BrO).....	49
3.33.2. Ensayos de inhibición con metil-8-bromo-octanoato (MBrO).....	49
3.34. Síntesis del derivado metil éster del 8-bromo-octanoato	49
3.35. Ensayo de transporte de [1- ¹⁴ C]octanoato en cultivos de <i>T. cruzi</i>	50

3.36. Ensayo de transporte de [1- ¹⁴ C]octanoato en competencia con ácido lipoico en cultivos de <i>T. cruzi</i>	50
3.37. Marcación isotópica de proteínas en cultivos de <i>T. cruzi</i>	50
3.38. Fraccionamiento subcelular con digitonina.....	51
4. Capítulo I.....	53
4.1. Introducción	53
4.2. Objetivos específicos.....	54
4.3. Resultados y Discusión	55
4.3.1. Efecto de análogos de ácido lipoico sobre la viabilidad celular.....	55
4.3.1.1. El 8-bromo-octanoato tiene un efecto letal en cultivos de <i>T. cruzi</i>	55
4.3.1.2. <i>T. cruzi</i> no transporta específicamente octanoato.....	57
4.3.1.3. El éster metílico de 8-bromo-octanoato (MBrO) tiene un efecto inhibitorio diez veces mayor que BrO	59
4.3.2. Efecto de análogos de ácido lipoico sobre el patrón de lipoilación.....	61
4.3.2.1. BrO y MBrO interfieren con la lipoilación de proteínas.....	61
4.3.2.2. Las condiciones de crecimiento afectan el patrón de lipoilación	62
4.3.2.2. Las actividades enzimáticas α -OADH son afectadas por MBrO y las condiciones de crecimiento	64
5. Capítulo II	66
5.1. Introducción	66
5.2. Objetivos específicos.....	68
5.3. Resultados y discusión	68
5.3.1. Identificación y análisis bioinformático de ortólogos de enzimas involucradas en la síntesis <i>de novo</i> de ácido lipoico	68
5.3.2. Análisis bioinformático de secuencias codificantes de enzimas putativas involucradas en la síntesis <i>de novo</i> de ácido lipoico en <i>T. brucei</i>	73
5.3.3. TbLipT complementa la función de Lip2 en levaduras mutantes	80
5.3.3.1. TbLipT revierte el fenotipo de crecimiento de mutantes <i>lip2</i> de levaduras	80
5.3.3.2. La complementación con TbLipT produce la lipoilación de la subunidades E2 en mutantes <i>lip2</i>	83
5.3.3.3. TbLipT octanoila la subunidad E2p de <i>E. coli</i>	85

6. Capítulo III	87
6.1. Introducción	87
6.2. Objetivos específicos.....	88
6.3. Resultados y discusión	89
6.3.1. Análisis bioinformático de una probable lipoato proteína ligasa de <i>T. brucei</i>	89
6.3.2. TbLipL complementa parcialmente la función de Lip3 en levaduras mutantes.....	90
6.3.2.1. TbLipL no revierte el fenotipo de crecimiento de mutantes <i>lip3</i> en YPG	90
6.3.2.2. TbLipL revierte el fenotipo de crecimiento de mutantes <i>lip3</i> en YNBDGly	90
6.3.2.3. TbLipL revierte el fenotipo de crecimiento de mutantes <i>lip3</i> en YPE.....	91
6.3.2.4. La complementación con TbLipL produce la lipoilación de E2k en mutantes <i>lip3</i>	94
7. Conclusiones	96
8. Bibliografía	99

Abreviaturas y símbolos

ACP	Proteína transportadora de grupos acilo
AL	Ácido lipoico
ADHL	Ácido dihidrolipoico
AoDH	Acetoína deshidrogenasa
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
AMP	Adenosina monofosfato
BCDH	<i>Branched chain α-ketoacid dehydrogenase</i>
BLASTP	<i>Basic local alignment search tool</i> para proteínas
BrO	Bromo-octanoato
BSF	<i>Blood Stream Form</i>
C	Carbono
CCG	Complejo de clivaje de glicina
CoA	Coenzima A
CO ₂	Dióxido de carbono
Da	Dalton
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DO	Densidad óptica
EC ₅₀	<i>Half maximal effective concentration</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
E3BP	<i>E3 binding protein</i>
FAD	Flavina adenina dinucleótido
FADH ₂	Flavina adenina dinucleótido reducida
FAS II	<i>Fatty acid synthesis II</i>
Fe	Hierro
g	Aceleración de la gravedad (fuerza centrífuga)
Glc	Glucosa
GSH	Glutación reducido
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
K	Lisina
KGDH	α -cetoglutarato deshidrogenasa
LAE	<i>Lipoate activating enzyme</i>
LB	Medio Luria-Bertani
LIAS	<i>Lipoic acid synthetase</i>
Lis	Lisina
LIT	Medio <i>Liver Infusion Tryptose</i>
ml	Mililitro
mLIT	Medio <i>Liver Infusion Tryptose</i> modificado
MOPS	Buffer 3-(<i>N-morpholino</i>)propanesulfonic acid
MBrO	Metil-bromo-octanoato
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducida
NH ₃	Amoníaco
nm	nanometro
ON	<i>Overnight</i>
PBS	Buffer fosfato salino
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PPi	Pirofosfato inorgánico
ROS	Especies reactivas del oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
S	Azufre
SAM	S-adenoil-metionina
Ser	Serina
Spp.	Especies del género
TAH	Tripanosomiasis africana humana
TPP	Tiamina pirofosfato
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidad de actividad enzimática
VSGs	Glicoproteínas variables de superficie
Ug	microgramo
Ul	microlitro
°C	Grados Celcius

Resumen

El tratamiento de las infecciones por tripanosomas depende de un pequeño número de drogas que tienen limitada eficacia y pueden causar severos efectos secundarios. El ácido lipoico (AL) es una molécula esencial para la viabilidad de la mayoría de los organismos procariotas y eucariotas de metabolismo aeróbico. No sólo por su participación como cofactor de complejos multienzimáticos que intervienen en la respiración celular y el metabolismo central sino también por su papel como regulador redox. Es por ello que se plantearon como objetivos principales de esta tesis: i) validar el metabolismo de lipoilación de proteínas en *Trypanosoma cruzi* como potencial blanco quimioterapéutico de efecto altamente pleiotrópico, y ii) identificar y caracterizar las enzimas involucradas en dicho metabolismo.

Dado que existen antecedentes en la utilización de análogos estructurales de AL como inhibidores del crecimiento de distintos microorganismos, incluyendo parásitos como *Plasmodium falciparum*, se decidió ensayar el efecto del inhibidor más conocido, 8-bromo-octanoato (BrO), sobre cultivos de *T. cruzi* epimastigotes de las cepas CL Brener y Dm28c. Se realizaron curvas de inhibición a distintas concentraciones que evidenciaron un efecto letal sobre los parásitos. No obstante, las concentraciones requeridas fueron altas como para ser relevantes en términos quimioterapéuticos ($EC_{50} = 0,591 \pm 0,190$ mM para CL Brener y $EC_{50} = 0,829 \pm 0,033$ mM para Dm28c). Tras demostrar que por la falta de transportadores específicos el BrO no era incorporado eficientemente por los parásitos, se sintetizó un derivado metil éster –metil-8-bromo-octanoato (MBrO)- presumiblemente más permeable a la membrana celular y se ensayaron nuevas curvas de inhibición mejorándose la efectividad de la droga en hasta un orden de magnitud ($EC_{50} = 66,18 \pm 10,40$ μ M y $62,17 \pm 7,46$ μ M para una y otra cepa).

Por otro lado, se estudió si este efecto letal en el crecimiento se debía efectivamente a la inhibición del metabolismo de lipoilación. Mediante la realización de western blots anti-lipoamida se pudo apreciar cómo el tratamiento con ambas drogas disminuía o suprimía por completo la lipoilación de proteínas. Más aún, observamos que la señal de una de las proteínas lipoiladas, la subunidad E2 (E2p) del complejo piruvato deshidrogenasa (PDH), mostraba una intensidad muy baja respecto del resto, razón por la cual nos preguntamos –teniendo en cuenta las funciones metabólicas de cada complejo lipoilado- si las condiciones de cultivo estarían influyendo.

Efectivamente, al crecer cultivos en condiciones de baja glucosa (de una concentración diez veces menor a la utilizada en el medio LIT convencional) y realizar extractos mitocondriales y nuevos western blots, la señal de E2p aumentó notoriamente. Por último, demostramos que las actividades α -oxoácido deshidrogenasas de los complejos lipoilados desaparecían en extractos de cultivos tratados con MBrO. Adicionalmente, vimos que la actividad PDH aumentó hasta cinco veces en condiciones de baja glucosa.

En su conjunto, estos resultados nos permitieron validar el metabolismo de lipoilación de proteínas de *T. cruzi* como un potencial blanco quimioterapéutico, que además sería de efecto altamente pleiotrópico. En segundo lugar, tras observar que BrO (análogo de AL) y octanoato libre (precursor de AL) son incorporados pobremente al interior celular, aportamos nuevas evidencias a favor de la ausencia de la vía de salvataje de AL en tripanosomátidos, en concordancia con otras evidencias reportadas en *T. brucei* por otros laboratorios.

Estos resultados plantearon la necesidad de profundizar nuestro conocimiento sobre los mecanismos involucrados en el metabolismo de lipoilación del parásito, los cuales deben ser lo suficientemente divergentes en términos evolutivos de aquellos presentes en el ser humano para poder diseñar fármacos inocuos para nuestra salud. Por ello se identificaron las enzimas que participan en la síntesis *de novo* de AL y se caracterizaron dos de ellas. En este caso, se trabajó con los genes de *Trypanosoma brucei* dado que el genoma de *T. cruzi* fue realizado sobre la cepa CL Brener, un híbrido de poliploidía incierta y especie que se caracteriza por poseer múltiples alelos.

En primer lugar, mediante ensayos de reversión de fenotipo de levaduras mutantes *lip2*, incapaces de sintetizar AL por falta de una octanoiltransferasa, se demostró que el gen Tb927.11.9390 (*TbLipT*) codifica una octanoiltransferasa específica para la proteína H y la subunidad E2p. Se ensayaron distintos medios de cultivo: YPG, YNBDGly, YPS e YPE (suplementado con AL u octanoato 50 μ M, y sin suplementar), ajustándose a nuestra hipótesis el comportamiento de las cepas complementadas con el gen de interés, en todos los casos y según el medio en cuestión. Estos resultados fueron revalidados mediante western blots anti-lipoamida, tanto en extractos de proteínas de levaduras mutantes como de *Escherichia coli* doble mutantes (cepa TM136), ambas expresando el gen de *T. brucei*. Cabe destacar que este último caso nos permitió dilucidar por completo la especificidad de TbLipT, dado que en las levaduras mutantes *lip2*, la actividad de una de las enzimas funcionales endógenas de la vía de síntesis de AL, Lip3, enmascaraba los efectos de nuestra enzima en estudio, no así en el caso de

TM136, donde pudimos determinar la capacidad de esta enzima de acilar la subunidad E2p.

Se realizó un estudio análogo al de TblipT con el gen Tb927.8.630 (*TblipL*), de particular importancia debido a que como hemos indicado, los tripanosomas carecen de la vía de salvataje de AL. Curiosamente, TblipL posee homología con lipoato proteína ligasas, enzimas que intervienen en dicha vía. No obstante, estas enzimas pertenecen a una superfamilia caracterizada por conservar cierto grado de homología secuencial y estructural pero de funciones diversas, incluyendo octanoiltransferasas, amidotransferasas, octanoil-CoA:proteína transferasas e incluso biotina proteína ligasas.

Se realizaron ensayos de reversión de fenotipo de la mutante de levadura *lip3*, carente de una enzima con aparente actividad amidotransferasa u octanoil-CoA:proteína transferasa. La complementación funcional provocada por TbLipL en los medios YNB DGly e YPE (suplementado y sin suplementar) indicaría que se trata también de una acil transferasa, pero específica para E2k, subunidad del complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa (KGDH). Ensayos de western blots anti-lipoamida realizados a partir de extractos mitocondriales de levaduras mutantes *lip3* complementadas con *TblipL* mostraron la aparición de una banda correspondiente a E2k, revalidando los resultados y conclusiones.

Proponemos que los tripanosomas carecen de una vía de salvataje de AL libre y lipoilan sus proteínas mediante la síntesis *de novo*. En esta vía, una octanoiltransferasa LipT transfiere residuos octanoilos desde octanoil-ACP a la proteína H del complejo de clivaje de glicina y a la subunidad E2 de PDH. Una ligasa/amidotransferasa (LipL) octanoila las subunidades E2 de KGDH y presumiblemente -dado que no está presente en levaduras- del complejo deshidrogenasa de α -cetoácido de cadena ramificada, a partir de un dador de octanoilos aún no caracterizado. Una tercera enzima identificada bioinformáticamente, LipS, de actividad lipoato sintasa y altamente conservada, catalizaría la inserción de dos átomos de azufre sobre los grupos octanoilos, ya incorporados a H, E2k y E2p, convirtiéndolas en las holoproteínas lipoiladas. La vía descrita, además, ha sido validada como un potencial blanco quimioterapéutico de efecto altamente pleiotrópico.

1. Introducción general

1.1. Los tripanosomátidos

1.1.1. Generalidades de los tripanosomátidos

Los tripanosomátidos son organismos unicelulares que se clasifican dentro del Dominio Eukarya, en el Reino Excavata, Subreino Discicristata, Phylum Euglenozoa, Clase Kinetoplastea, Orden Trypanosomatida, Familia Trypanosomatidae (Cavalier-Smith, 2002). Estos protozoos monoflagelados son parásitos obligados y muchos tienen un ciclo de vida digenético que alterna entre un insecto vector y un hospedador, generalmente vertebrado, aunque también puede ser una planta; otros son monogenéticos, parasitando sólo insectos (Jackson, 2015).

Como miembros de la clase de los kinetoplástidos poseen mecanismos de organización y expresión génica peculiares, entre ellos: (i) edición del ARNm mitocondrial compleja y dependiente de energía; (ii) una organización del ADN mitocondrial única; (iii) corte y empalme entrecruzado (*trans-splicing*) de todos los transcritos de ARNm; (iv) agrupación de genes en grupos policistrónicos; y (v) modificaciones especiales de los nucleótidos (Simpson y col., 2006).

Por otro lado, sintetizan ácidos grasos *de novo* mediante un mecanismo único, basado en complejos enzimáticos microsomales denominados elongasas (Lee y col., 2007); son capaces de evadir al sistema inmunológico del hospedador utilizando proteínas de superficie involucradas en mecanismos de variación antigénica; dependen de las fuentes de carbono presentes en el hospedador para su metabolismo energético (Bringauid y col., 2006); poseen gran parte de la vía glucolítica compartimentalizada en organelas conocidas como glicosomas; y en particular, poseen una organela característica –que da su nombre al clado– conocida como kinetoplasto, que representa la agrupación del material genético mitocondrial, con un arreglo inusual de minicírculos y maxicírculos de ADN (Simpson y col., 2006).

Dentro de la diversidad de los tripanosomátidos se encuentran parásitos humanos como *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* y numerosas especies del género *Leishmania*, de enorme importancia dado que colectivamente causan la enfermedad y muerte de millones de personas (e infecciones en otros mamíferos), principalmente en poblaciones vulnerables de países subdesarrollados o en vías de

desarrollo. La secuenciación de sus genomas ha facilitado el estudio y comprensión de estos parásitos cuyos ciclos de vida, tejidos y células blanco así como patogénesis de las enfermedades difieren considerablemente pese a formar parte del mismo orden (El-Sayed y col., 2005). Es por todo ello que *T. cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania* spp. han sido los tripanosomátidos más estudiados en las últimas décadas.

1.1.2. *Trypanosoma cruzi* y el Mal de Chagas

T. cruzi es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, también llamada “tripanosomiasis americana”. Se distribuye a lo largo de toda América Latina, pero en los últimos años se ha detectado su expansión hacia lugares tan diversos como Estados Unidos, España, Suiza y Japón. Esta expansión se debe principalmente a la emigración de personas infectadas, ya que si bien *T. cruzi* es usualmente transmitido por un insecto vector, también puede contagiarse por transfusión de sangre, trasplantes de órganos o transmisión congénita. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que son alrededor de 10 millones las personas infectadas con el parásito en todo el mundo. Anualmente, unas 60.000 personas son infectadas cada año y más de doce mil mueren por la enfermedad (Leslie, 2011).

El parásito infecta fundamentalmente mamíferos salvajes como armadillos, comadrejas, ratas y mapaches, e incluso animales domésticos como perros y gatos. Se transmite al hombre por medio de insectos triatomíneos hematófagos, siendo *Triatoma infestans* (conocido vulgarmente como “vinchuca”) el vector más común en Argentina. La infección ocurre a través de las heces que el insecto deposita sobre la picadura tras alimentarse, y que la persona internaliza al rascarse o llevándoselas sin saber a la boca, ojos o heridas. La enfermedad prevalece en zonas de mayor pobreza, con casas precarias de adobe y paja, por ejemplo, que ofrecen grietas donde el insecto puede esconderse durante el día. Una forma nueva de infección descubierta recientemente es a través de la ingestión de comidas o bebidas (particularmente, jugos frutales) contaminadas con las heces del insecto vector (Leslie, 2011).

Inicialmente, la enfermedad de Chagas cursa una *etapa aguda* durante la cual el parásito es intracelular y se encuentra protegido del sistema inmunitario del hospedador. Esta etapa comienza entre 6 y 10 días posteriores a la infección, pero puede extenderse hasta 2 meses; la mayoría de las veces resulta asintomática, pero en algunos casos es posible detectar inflamación localizada en el sitio de infección, producida por la

acumulación de líquido en la zona, lo que conduce a la formación de un edema denominado *chagoma*. Durante este período es posible detectar parásitos tanto en sangre (bajo la forma *tripomastigote*) como en los tejidos afectados, principalmente en forma de quistes o “*nidos de amastigotes*” (Barret y col., 2003).

Posteriormente sobreviene una *fase indeterminada*, que el paciente cursa de manera silenciosa y asintomática, alcanzándose un balance inmunológico entre el parásito y su hospedador que conduce a la depuración de los parásitos en circulación. Esto dificulta mucho el diagnóstico directo de la enfermedad. Alrededor del 70-85% de los casos permanece en este estado indeterminado. Sin embargo, *T. cruzi* continúa residiendo en el hospedador y años o décadas posteriores a la infección inicial, el 20 o 30% de los pacientes que no han recibido tratamiento evolucionan hacia una *etapa crónica*, caracterizada por presentar lesiones irreversibles, principalmente en corazón y sistema digestivo, que conllevan a la muerte del paciente (Barrett y col., 2003; Leslie, 2011).

Los tratamientos actuales contra la enfermedad fueron desarrollados hace décadas y poseen efectividad parcial. Las únicas drogas que se utilizan, *benznidazol* y *nifurtimox*, producen importantes efectos colaterales. Por ejemplo, nifurtimox puede llegar a generar anorexia y daños en las células nerviosas, mientras que el benznidazol puede inducir daños en la piel, en ocasiones tan graves como para causar la muerte del paciente. Estas drogas deben tomarse entre dos y tres meses para ser efectivas y muchos pacientes nunca terminan un tratamiento tan largo. Por otro lado, sólo tendrían efecto durante la fase aguda de la enfermedad (con una tasa de curación del 60-70%), etapa en la cual la mayoría de las personas ignoran su condición de infectados. No se ha demostrado que tengan un efecto significativo durante la etapa crónica (Leslie, 2011).

Esto hace necesario no sólo el desarrollo de quimioterapia específica, sino también la identificación de nuevos blancos de acción, de manera que en su conjunto permitan combatir efectivamente esta enfermedad y eventualmente erradicarla (Barrett y col., 2003; Urbina y col., 2003).

1.1.3. *Trypanosoma brucei* y la Enfermedad del sueño

T. brucei es el agente causal de la enfermedad del sueño, también conocida como “tripanosomiasis africana humana (TAH)”. Esta enfermedad es endémica del África subsahariana y es causada por dos subespecies distintas del parásito, dependiendo de la región. *T. brucei gambiense* es un parásito antroponótico encontrado en 24 países de África central-occidental, y causa un síndrome crónico. *T. brucei rhodesiense* es zoonótico y endémico de 13 países del sur y este de África, y causa un síndrome agudo. No obstante, debido a las migraciones poblacionales y a los cambios climáticos, comienzan a observarse superposiciones de ambos parásitos y los respectivos síndromes asociados. Se estima que unos 70 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad: 57 millones por *T.b. gambiense* y 12,3 millones por *T.b. rhodesiense* (Bonnet y col., 2015).

La enfermedad es transmitida a través de la mosca tsé-tsé, perteneciente al género *Glossina* (que incluye varios subgéneros). Cuando el insecto portador se alimenta de sangre, inyecta su saliva para evitar la coagulación y de esta manera inyecta también tripanosomas tripomastigotes metacíclicos. Clínicamente, la enfermedad transcurre a través de dos etapas y los síntomas para ambos síndromes, agudo y crónico, son usualmente los mismos, aunque difieren en su frecuencia, severidad y cinética. De hecho, *T. b. rhodesiense* puede causar la muerte del paciente en sólo seis meses, mientras que pacientes infectados con *T. b. gambiense* pueden sobrevivir más de diez años (Bonnet y col., 2015).

La primera etapa se conoce como *hemolinfática* o *de transmisión sanguínea*, y se caracteriza por la aparición intermitente de fiebre, dolores de cabeza, prurito y anemia, entre otros síntomas. Una vez que los parásitos han atravesado la barrera hematoencefálica comienza la etapa *meningoencefálica*, cuyos síntomas más importantes son neuropsiquiátricos e incluyen trastornos en el sueño, perturbaciones en la movilidad, parálisis de las extremidades, irritabilidad, comportamientos agresivos y reacciones psicóticas. Esta segunda etapa es fatal si no se la trata en tiempo y forma (Bonnet y col., 2015).

Al igual que con la enfermedad de Chagas, los tratamientos utilizados contra todas las formas de tripanosomiasis africana son poco eficaces, tóxicos y tienden a desarrollar resistencia. Además, los tratamientos son prolongados y requieren

profesionales de la salud familiarizados con la enfermedad (Barrett y col., 2003; Fairlamb, 2003; Stich y col., 2003). De todas maneras, la quimioterapia junto con el control del vector son las principales estrategias para combatir esta dolencia, ya que no es posible obtener vacunas efectivas, debido en gran parte al fenómeno de variación antigénica, mecanismo de evasión que le permite al parásito eludir el sistema inmunitario del hospedador.

Una tercera subespecie, *T. brucei brucei*, infecta exclusivamente animales domésticos. Endémica de África, es el agente causal de la tripanosomiasis africana animal o *Nagana*, y si bien no es patógena para el ser humano, afecta gran variedad de animales de ganado, importantes para el desarrollo social y económico de las regiones donde se encuentra (Bonnet y col., 2015). Lo mismo ocurre con las especies *T. congolense* y *T. vivax*, esta última también encontrada en países occidentales.

1.1.4. Ciclos de vida

1.1.4.1. *Trypanosoma cruzi*

El ciclo (Figura 1.1) se inicia cuando el vector infectado (vinchuca) se alimenta de la sangre del hospedador mamífero, depositando con sus deyecciones *tripomastigotes metacíclicos* que ingresan al organismo a través de la herida producida por la picadura o por las mucosas (1). La forma metacíclica es capaz de infectar cualquier tipo de célula, aunque generalmente por ser la primer línea de defensa del hospedador, son macrófagos y células dendríticas. De esta manera se inicia un ciclo intracelular que se prolonga entre 4 y 5 días. Dentro de las células, el parásito pierde su flagelo y se redondea diferenciándose a *amastigote* (2), el cual prolifera por fisión binaria en el citoplasma, formando un pseudocisto (3). Una vez que la carga celular de amastigotes es alta, se produce la diferenciación hacia la forma alargada *tripomastigote*, que escapa del pseudocisto destruyendo la célula hospedadora y liberando los parásitos a los espacios intersticiales y al torrente sanguíneo (4). En este estadio, el parásito tiene la habilidad de invadir otras células, repitiéndose indefinidamente el ciclo de infección (4-3-4), y es en este punto que se produce la *fase aguda* de la enfermedad. Los tripomastigotes sanguíneos son ingeridos por el insecto vector (5) y en el intestino se diferencian a *epimastigotes* (6) también replicativos (7) y con un flagelo extendido. Estos últimos se adhieren por interacciones hidrofóbicas a la cutícula cerosa de la pared del intestino

distal antes de diferenciarse a *trypomastigotes metacíclicos* (8). Este proceso, conocido como *metaciclogénesis*, podría ser inducido por la interacción del flagelo y el sustrato al cual se adhiere. Una vez formados, los tripomastigotes metacíclicos son excretados, e infectan al hospedador mamífero, recomenzando el ciclo (1) (Tyler y Engman, 2001).

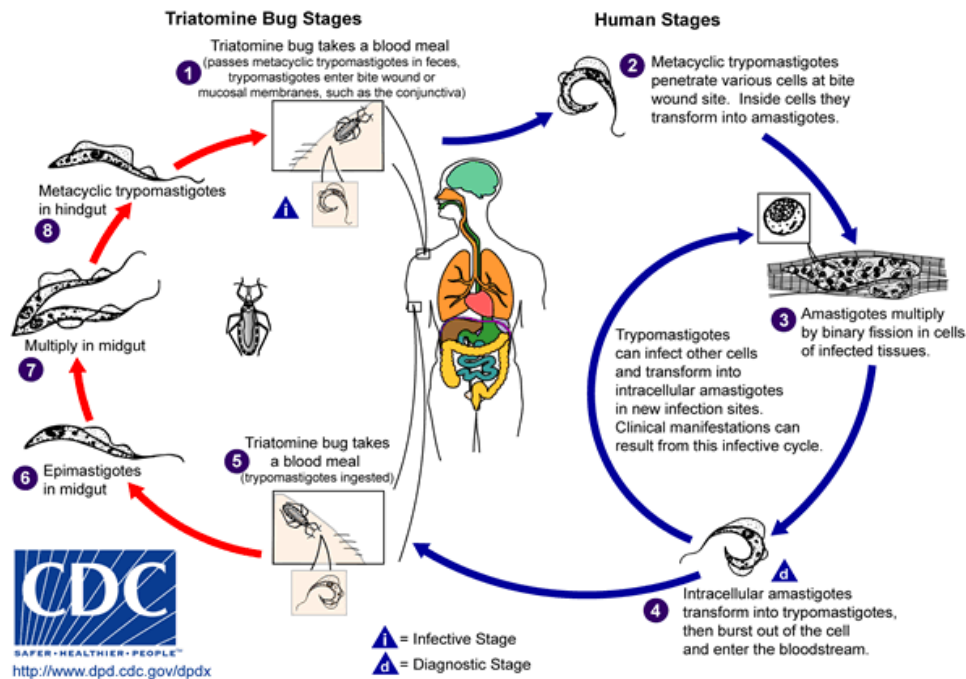


Figura 1.1. Ciclo de vida de *T. cruzi*. [Adaptado del sitio web del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (Atlanta, Estados Unidos): <http://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAfrican/index.html>].

1.1.4.2. *Trypanosoma brucei*

A diferencia de *T. cruzi*, que adopta una existencia intracelular en el hospedador, *T. brucei* se aloja extracelularmente (Figura 1.2). Como se mencionó en un apartado anterior, cuando la mosca tsé-tsé infectada se alimenta de sangre, inyecta su saliva junto con tripanosomas tripomastigotes metacíclicos en el tejido epidérmico del hospedador mamífero (1) (Bonnet y col., 2015). Estos parásitos ingresan al sistema linfático y torrente sanguíneo bajo la *forma sanguínea* (BSF, del inglés: *blood stream form*) (2). BSF prolifera por división binaria en la sangre del hospedador en forma de tripomastigote sanguíneo alargado (*slender*) (3), expresando secuencialmente glicoproteínas variables de superficie (VSGs, del inglés: *variable surface glycoproteins*) –antigénicamente diferentes– para evadir la respuesta inmunitaria en un proceso conocido como *variación antigénica*. Cuando la densidad celular aumenta y alcanza cierto nivel, la forma “alargada” proliferativa, eventualmente se diferencia a la forma

“rechoncha” (*stumpy*), no proliferativa y de morfología más redondeada, en la cual comienzan a expresarse ciertos genes específicos del estadio procíclico (4); además se pierde la capa de VSGs (Matthews, 2005).

La mosca tsé-tsé se infecta cuando pica un mamífero infectado e ingiere dichos tripomastigotes rechonchos (5). En el intestino de la mosca, los parásitos se diferencian a *tripomastigotes procíclicos* (PCF, del inglés: *procyclic form*) y se multiplican por fisión binaria (6). Por último, migran a la glándula salival de la mosca, se diferencian a la forma *epimastigote* (7) y continúan su multiplicación por fisión binaria (8). Eventualmente, tras una etapa adicional de multiplicación, una fracción de la población pasa a su forma *tripomastigote metacíclico*, y tras reexpresar VSGs, el parásito es liberado en el lumen de la glándula preparándose para una nueva inoculación en algún hospedador mamífero (1) (Matthews, 2005).

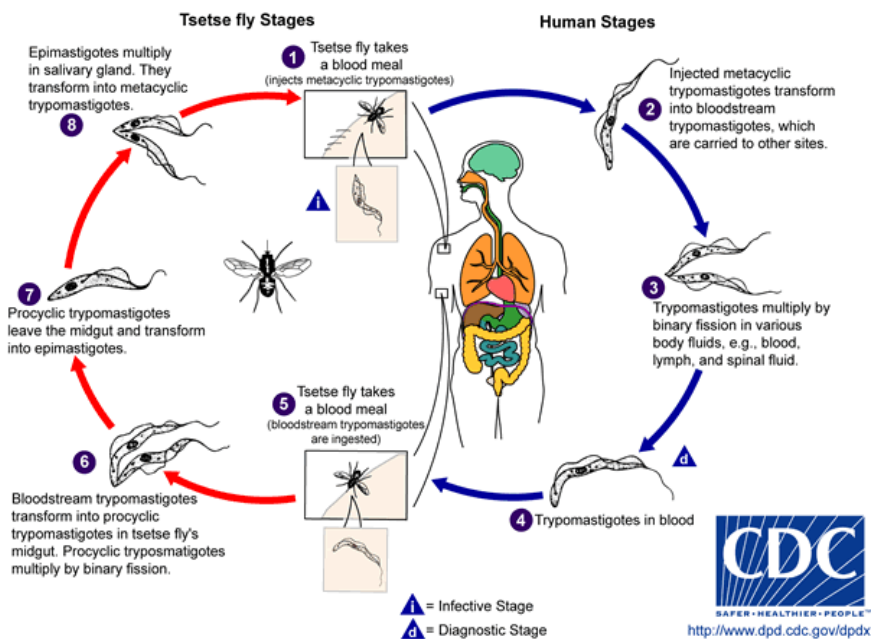


Figura 1.2. Ciclo de vida de *T. brucei*. [Adaptado del sitio web del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (Atlanta, Estados Unidos): <http://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAfrican/index.html>].

1.2. El ácido lipoico

1.2.1. Estructura y propiedades fisicoquímicas

El ácido α -lipoico (AL), también conocido como ácido 6,8-tióctico o ácido 1,2-ditiol-3-valérico [nombre según IUPAC: ácido 5-(1,2-ditiolan-3-il) pentanoico] fue descubierto originalmente como un factor desconocido derivado de extractos biológicos que estimulaba el crecimiento bacteriano en presencia de determinadas fuentes de carbono (Spalding y Prigge, 2010). Logró ser aislado por primera vez a partir de hígado bovino en 1951 y se lo llamó *ácido lipoico* por ser un compuesto lipofílico, con propiedades acídicas, e involucrado en el anabolismo de ácidos grasos (Spalding y Prigge, 2010). Es un ácido orgánico de ocho carbonos que contiene un grupo disulfuro (Figura 1.3A). Posee también un centro quiral simple y un carbono asimétrico unidos a cuatro grupos funcionales diferentes por lo que es un compuesto ópticamente activo que puede existir en sus dos formas isoméricas: R-AL y S-AL (Figura 1.3B); sin embargo, sólo el isómero R es la forma encontrada en la naturaleza (Singh y Jialal, 2008; Shay y col., 2009; Goraca y col., 2011).

Los dos grupos tioles del ácido lipoico pueden encontrarse en su forma oxidada o reducida, denominándose ácido lipoico y ácido dihidrolipoico (ADHL), respectivamente (Packer y col., 1995). AL es muy reactivo debido a la tensión del enlace S-S-C en el anillo disulfuro heterocíclico, razón por la cual el sistema AL/ADHL posee un potencial redox excepcionalmente bajo (Goraca y col., 2011). Por otro lado, AL y ADHL son moléculas anfipáticas, capaces de solubilizarse tanto en medios acuosos como en membranas lipídicas (Packer y col. 2001; Bilska y Wlodek, 2005; Goraca y col., 2011).

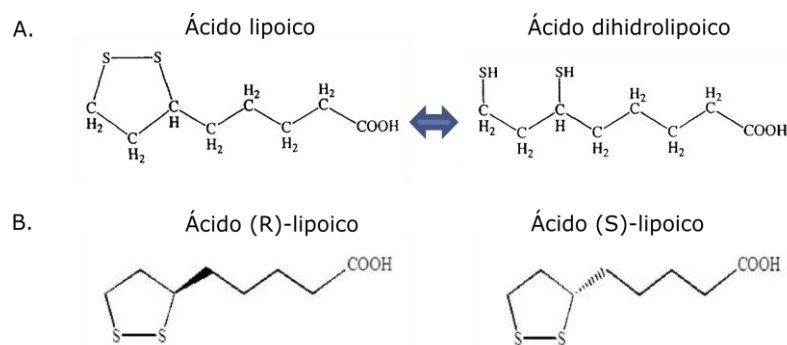


Figura 1.3. Estructura del ácido lipoico. **A.** AL puede encontrarse tanto en forma oxidada como reducida. **B.** Enantiómeros de AL; sólo el isómero R se encuentra en la naturaleza y tiene actividad biológica. (Figuras 1.3A y 1.3B adaptadas de Packer y col., 1995, y Shay y col., 2009, respectivamente).

Dado su rol en los procesos bioquímicos de la célula (ver más adelante), AL fue considerado inicialmente una vitamina perteneciente al complejo B. En la actualidad se sabe que muchos organismos animales, incluyendo al ser humano, son capaces de sintetizarlo, por lo que dejó de ser considerado como vitamina (Bilska y Wlodek, 2005).

1.2.2. Funciones

AL ocupa un rol central en la fisiología celular de muchos organismos eucariotas y procariotas, dadas sus excepcionales propiedades como agente antioxidante y su participación como cofactor en complejos multienzimáticos claves en el metabolismo central (Spalding y Prigge, 2010).

1.2.2.1. Ácido lipoico libre: principal agente antioxidante celular

Como ya se mencionó, la reactividad química de AL es conferida por el anillo ditiol (Shay y col., 2009). Sus propiedades antioxidantes se deben principalmente a tres mecanismos de acción: (i) eliminación directa de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*); (ii) regeneración de antioxidantes endógenos y (iii) acción quelante de metales de transición como cobre y hierro, lo que reduce la generación de ROS (Singh y Jialal, 2008).

Por otro lado, cambiando el estado tiol-redox intracelular, la estructura de proteínas involucradas en la señalización celular puede modificarse, resultando en la alteración de su actividad así como en la de factores de transcripción relacionados (Shay y col., 2009; Packer y Cadenas, 2011).

1.2.2.1.1. Eliminación directa de especies reactivas del oxígeno

La cupla AL/ADHL posee un potencial de reducción estándar excepcionalmente bajo ($E_o' = -0,29V$). Esto convierte al ADHL en uno de los antioxidantes más potentes conocidos en la naturaleza. Existe evidencia de que tanto AL como ADHL son capaces de eliminar una gran variedad de ROS (Tabla 1.I). Ambos pueden eliminar radicales hidroxilo y ácido hipocloroso. AL también elimina el radical oxígeno singlete y ADHL puede neutralizar radicales libres sin convertirse en uno durante el proceso (Shay y col., 2009).

Tabla1.I. Valores de potenciales de reducción estándar (E_o') en sistemas biológicos redox y ROS.

(Adaptado de Bilska y Wlodek, 2005).

Sistema	E_o' (V)
$\text{NAD}^+ + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ = \text{NADH} + \text{H}^+$	-0,32
$\text{lipoato} + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ = \text{dihidrolipoato}$	-0,29
$\text{GSSG} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- = 2\text{GSH}$	-0,23
$\text{FAD} + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ = \text{FADH}_2$	-0,06
$\text{dihidroascorbato} + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ = \text{ascorbato}$	-0,058
$\text{TO} + \text{H}^+ + \text{e}^- = \text{TOH}$ (radical cromanoxilo del tocoferol)	0,48
$1/2\text{O}_2 + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ = \text{H}_2\text{O}$	0,82
$\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ = \text{O}_2'$	0,87
$\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$	1,32
$\text{'OH} + \text{H}^+ + \text{e}^- = \text{H}_2\text{O}$	2,31

2.2.2.1.2. Regeneración de antioxidantes endógenos

Debido a su poder reductor único y a sus cualidades anfipáticas, AL es considerado *antioxidante de antioxidantes*, ya que la dupla AL/ADHL es capaz de regular las concentraciones celulares de las formas reducidas de los diferentes antioxidantes, tanto hidro como liposolubles –una propiedad única entre los antioxidantes-, siendo el glutatión (GSH) el más importante (Bilska y Wlodek, 2005; Shay y col., 2009). Otros antioxidantes regenerados por ADHL son el ascorbato, la vitamina E y la coenzima Q₁₀. Tal interacción suele conocerse como *red de antioxidantes* (Packer y col., 2001).

Por otro lado, existe evidencia creciente de que AL podría actuar indirectamente en el mantenimiento de los niveles redox celulares induciendo la captación o fomentando la síntesis de antioxidantes endógenos de bajo peso molecular o de enzimas antioxidantes (Shay y col., 2009).

1.2.2.1.3. Acción quelante de metales de transición

AL y ADHL son capaces de quelar *in vitro* diferentes cationes con actividad redox, y existen evidencias de que podrían hacerlo *in vivo*, disminuyendo de esta forma oxidaciones vía radicales libres catalizadas por estos metales, en condiciones donde se acumulan (Singh y Jialal, 2008; Shay y col., 2009). Por ejemplo, se observó que la acción quelante de ADHL sobre cobre y hierro en el cerebro, disminuyó el daño

generado por radicales libres, teniendo un efecto positivo sobre el Alzheimer (Shay y col., 2009).

La acción quelante (y removedora) sobre metales de transición aún resta ser demostrada y elucidada completamente *in vivo*. Pero se cree que LA posee la capacidad de modular el *pool* celular variable de estos metales, sin causar su agotamiento (Shay y col., 2009).

1.2.2.4. Beneficios del ácido lipoico sobre afecciones humanas

Dada su acción pleiotrópica en múltiples aspectos del metabolismo celular, sobre todo en aquellos relacionados con el metabolismo redox, una cantidad creciente de estudios están demostrando los efectos beneficiosos de AL contra afecciones humanas relacionadas directa o indirectamente con alteraciones en el balance redox: diabetes, aterosclerosis, procesos de degeneración neuronal, enfermedades en las articulaciones, tumores e incluso SIDA (Bilska y Wlodek 2005; Singh y Jialal, 2008; Shay y col., 2009).

Es por ello que AL actualmente ya se comercializa como suplemento dietario (producido mayoritariamente como mezcla racémica) y se siguen investigando sus propiedades farmacoterapéuticas (Shay y col., 2009).

1.2.2.2. Ácido lipoico unido a proteínas: cofactor enzimático

AL es cofactor de dos importantes clases de complejos multienzimáticos involucrados en el metabolismo central: los complejos α -oxoácido deshidrogenasa (α -OADH), que catalizan reacciones de descarboxilación oxidativa; y el complejo de clivaje de glicina (CCG), que interviene en reacciones de incorporación de unidades de un carbono (Spalding y Prigge, 2010). Existe evidencia creciente de que AL unido a proteínas también es capaz de cumplir un papel como antioxidante, aunque no está claro si en todos los organismos (Wang y col., 2011; Storm y Müller, 2012).

Los complejos α -OADH están compuestos por múltiples copias de cada una de tres subunidades conocidas como E1, E2 y E3. CCG difiere un poco en su arquitectura y está formado por cuatro proteínas unidas más débilmente entre sí: P, H, T y L (Hassan y Cronan, 2011).

En cada uno de estos complejos, un componente específico (E2 en α -OADHs; H en CCG) es modificado por la unión covalente entre el grupo carboxilo de AL y el

grupo ϵ -amino de un residuo conservado de lisina (Figura 1.4A). Estos grupos *lipoamida* protruyen desde la superficie de dominios altamente conservados, conocidos como *dominios lipoilables*, y actúan como brazos basculantes que intercambian intermediarios de reacción entre diferentes sitios activos del complejo (Figura 1.4B) (Hassan y Cronan, 2011). Durante los ciclos catalíticos, el enlace disulfuro del AL alterna entre las formas lipoamida oxidada y dihidrolipoamida reducida (Spalding y Prigge, 2010).

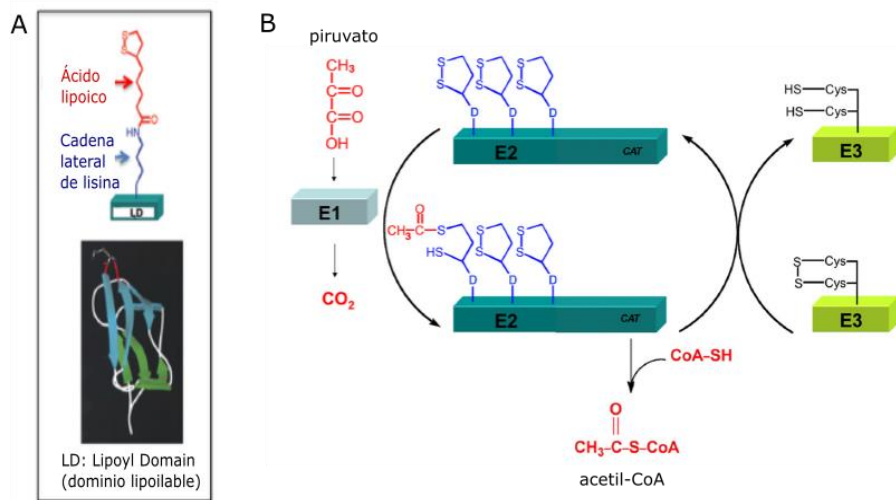


Figura 1.4.A. Estructura del grupo lipoamida (lipoil-lisina) que protruye del dominio lipoilable. **B.** Representación esquemática de la acción del cofactor unido a E2 como brazo basculante que intercambia intermediarios de reacción entre sitios catalíticos. (Adaptado de Hassan y Cronan, 2011).

1.2.2.2.1. Complejos α -oxoácido deshidrogenasas

Hasta la fecha han sido caracterizados cuatro grandes complejos (Spalding y Prigge, 2010). Tres pertenecen a la familia de las α -oxoácido deshidrogenasas:

- *Piruvato deshidrogenasa* (PDH): cataliza la descarboxilación oxidativa del piruvato, generando acetil-coenzima A (acetil-CoA), sustrato que participa en muchas vías metabólicas centrales como el ciclo de Krebs, biosíntesis y elongación de ácidos grasos y biosíntesis de isoprenoides.
- *α -cetoglutarato deshidrogenasa* (KGDH, del inglés: *α -ketoglutarate dehydrogenase*): convierte α -cetoglutarato en succinil-coenzima A (succinil-CoA), que puede ser utilizado en el ciclo de Krebs o puede ser derivado a la síntesis de aminoácidos y grupos hemo.

- *Deshidrogenasa de α -cetoácidos de cadena ramificada* (BCDH, del inglés: *branched chain α -ketoacid dehydrogenase*): participa en la degradación de aminoácidos de cadena ramificada para generar los α -cetoácidos correspondientes unidos a coenzima A, que pueden ser convertidos en intermediarios de reacción del ciclo de Krebs o utilizados en la síntesis de ácidos grasos de cadena ramificada.

El cuarto complejo se conoce como *acetoína deshidrogenasa* (AoDH), posee gran homología con las PDHs y es utilizada por muchas bacterias para producir acetil-CoA a partir de la descarboxilación oxidativa de acetoína (3-hidroxi-2-butanona), derivada del piruvato.

Estos complejos poseen un tamaño muy grande, mayor que el de un ribosoma. Están organizados alrededor de un núcleo de trímeros de subunidades E2 estrechamente unidas, que forman una especie de jaula octahédrica de 24 subunidades o icosaédrica de 60 subunidades, dependiendo del organismo (Perham, 1991; Hassan y Cronan, 2011). Las subunidades E2 cumplen un rol fundamental, tanto en el anclaje de las otras subunidades (E1 y E3) como en la canalización de los sustratos. Son proteínas altamente segmentadas (Figura 1.5), y están compuestas por dominios modulares independientes, unidos a través de regiones bisagra ricas en alanina y prolina (Hassan y Cronan, 2011). La región amino terminal de cada subunidad E2 contiene de uno a tres dominios lipoilables (dependiendo del organismo y la enzima), de 80 aminoácidos aproximadamente; cada dominio tiene un único sitio de unión a AL (Perham 1991; Spalding y Prigge, 2010; Hassan y Cronan, 2011).

En el centro de E2 se encuentra un dominio de unos 50 aminoácidos que participa principalmente en la unión a subunidades E3 (y se cree que también a E1). Por último, en el extremo carboxilo terminal, que es de mayor extensión y permanece ensamblado formando el núcleo, está el sitio catalítico aciltransferasa (motivo HXXXDG; Perham, 1991) de la subunidad así como un sitio de unión a E1 (Perham 1991; Spalding y Prigge, 2010; Hassan y Cronan, 2011).

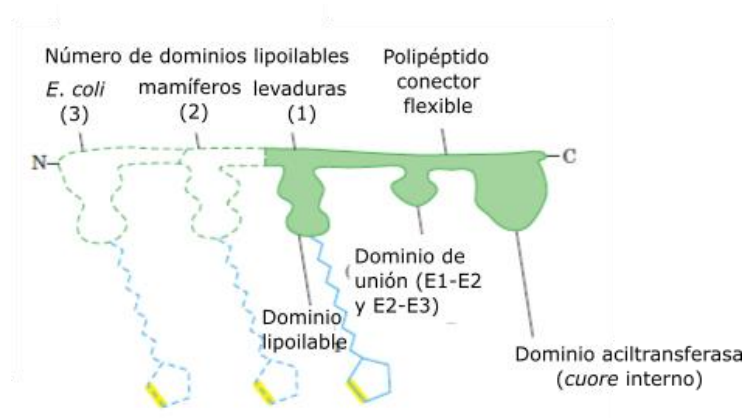


Figura 1.5. Estructura modular de las subunidades E2 de α -OADHs. (Adaptado de Nelson y Cox, 2005.)

Tanto E1 como E3 se encuentran como proteínas diméricas (Perham, 1991). E1 posee actividad acil descarboxilasa y E3 es una flavoproteína con actividad dihidrolipoamida deshidrogenasa. Múltiples copias de E1 y E3 se unen al núcleo E2 formando la capa externa del complejo. Los motivos lipoilados de los dominios lipoilables, junto con las regiones bisagra, forman largos brazos que protruyen en la capa externa llevando los intermediarios de reacción a los sitios activos distantes de E1 y E3 (Perham, 1991; Hassan y Cronan, 2011).

Asociada a complejos PDH de eucariotas, se encuentra una proteína adicional llamada *proteína de unión a E3* (E3BP, del inglés: E3 binding protein), antes conocida como “Proteína X” (Perham, 1991; Spalding y Prigge, 2010). Ésta también contiene AL, que podría jugar un papel en la unión de E3 y facilitar la transferencia electrónica. Posee una estructura similar a E2: un dominio lipoilable N-terminal, un dominio intermedio de unión a polipéptidos y una región C-terminal, que a diferencia de la N-terminal, no tiene homología en su secuencia con E2 y carece de actividad aciltransferasa (Perham, 1991). El cofactor lipoato (lipoamida) puede ser acetilado y reducido por las subunidades E1 y E3 de PDH, respectivamente, pero E3BP no tendría la capacidad de generar acetil-CoA, posiblemente debido a la ausencia del residuo catalítico de histidina presente en E2 (Spalding y Prigge, 2010).

Todos los complejos α -oxoácido deshidrogenasas catalizan la descarboxilación irreversible de α -cetoácidos para producir acil-coenzima A (acil-CoA), NADH y CO_2 .

AoDH no utiliza como sustrato un α -cetoácido sino acetoína (3-hidroxi-2-butanona) y en la reacción se libera acetaldehído en vez de CO_2 (Spalding y Prigge, 2010).

A continuación se describe el mecanismo de acción para el complejo PDH (Figura 1.6B), aunque los principios generales se aplican al resto de los complejos, como puede verse en la Figura 1.6A, variando sólo los sustratos y productos involucrados en cada reacción (Perham, 1991; Spalding y Prigge, 2010).

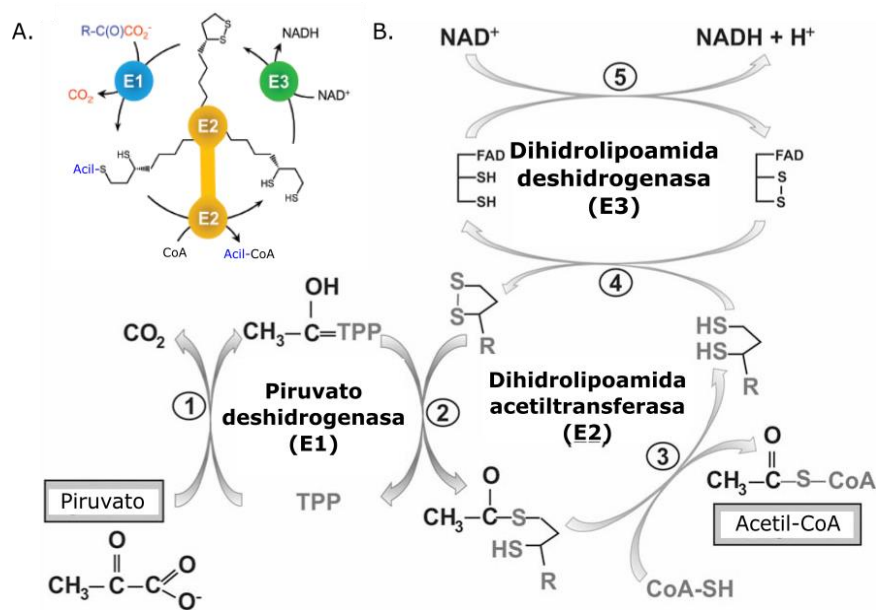


Figura 1.6. Mecanismo de acción compartido por todos los complejos α -cetoácido deshidrogenasa. (Adaptado de Spalding y Prigge, 2010). **B.** Mecanismo de acción de PDH, visto más en detalle. (Adaptado de Storm y Müller, 2012).

La reacción comienza con la descarboxilación del sustrato, dependiente del cofactor tiamina pirofosfato (TPP), catalizada por la subunidad E1 (*acil descarboxilasa*). El carbono ácido del anillo tiazol de TPP ataca el grupo carbonilo (C2) formando un intermediario unido covalentemente. La ruptura de este intermediario libera CO_2 y genera un carbanión activado unido a TPP. Esta especie acila uno de los átomos de azufre presentes en el cofactor lipoamida (formando un enlace tioéster), dejando el segundo átomo de azufre reducido a un grupo tiol. E2 cataliza luego la transferencia del grupo acilo desde el grupo dihidrolipoamida recientemente formado a la coenzima A. Para regenerar el cofactor en su forma electrofílica lipoamida, la subunidad E3 (*dihidrolipoamida deshidrogenasa*) oxida la dihidrolipoamida utilizando el cofactor FAD. Esta subunidad E3 es compartida con frecuencia por los diferentes

complejos, a diferencia de E1 y E2, que son específicas. Finalmente, el FADH_2 formado es reoxidado a través de la reducción de NAD.

En eucariotas, los tres complejos α -cetoácido deshidrogenasa son de ubicación mitocondrial. AoDH sólo se ha encontrado en procariotas.

1.2.2.2.1. Complejo de clivaje de glicina

Está compuesto por cuatro proteínas: tres enzimas y una proteína transportadora. Las enzimas son: la proteína P (una descarboxilasa que contiene piridoxal fosfato) o *glicina deshidrogenasa*; la proteína T, una *aminometil transferasa*; y la proteína L, de actividad *dihidrolipoamida deshidrogenasa* (usualmente la misma E3 descrita anteriormente). La proteína transportadora es H, y utiliza AL como cofactor (Kikuchi y col., 2008).

Cataliza la descarboxilación reversible de glicina. En la dirección catabólica produce NADH , CO_2 , NH_3 y el dador de unidades de un carbono metilen-tetrahidrofolato ($5,10\text{-CH}_2\text{-THF}$), requerido para la biosíntesis de algunos aminoácidos como la metionina (dador de grupos metilo a través de S-adenosil-metionina), purinas y timidilato; CCG también permite la utilización de glicina como fuente de carbono y nitrógeno en algunos organismos. En dirección anabólica, la glicina sintetizada puede ser utilizada para la síntesis de proteínas o como sustrato de la ácido δ -aminolevulínico sintasa en el primer paso de la vía de síntesis del grupo hemo (Kikuchi y col., 2008; Spalding y Prigge, 2010).

En eucariotas, el complejo es de ubicación mitocondrial, con excepción del protozoo amitocondriado *Trichomonas vaginalis*, en el cual se encuentra en organelas conocidas como hidrogenosomas. El mecanismo de acción es análogo al de α -OADHs, como puede observarse en la Figura 1.7.

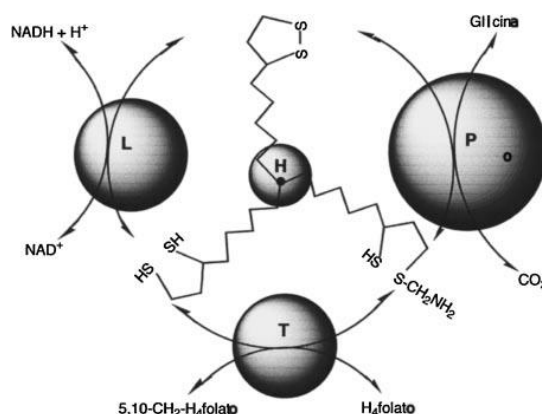


Figura 1.7. Estructura y mecanismo de acción de CCG. (Adaptado de Kikuchi y col., 2008.)

1.2.4. Mecanismos de lipoilación

En la naturaleza se conocen dos estrategias para lipoilar proteínas. Una es la síntesis *de novo* de ácido lipoico y otra es el rescate o salvataje de ácido lipoico exógeno (Spalding y Prigge, 2010; Cronan, 2014, 2016). Algunos organismos poseen ambas vías de lipoilación mientras que otros poseen sólo una.

Uno de los organismos donde más se estudiaron y mejor se conocen estos mecanismos es en la enterobacteria *Escherichia coli*. Esta especie posee ambas vías de lipoilación, las cuales han sido caracterizadas en detalle. Tres complejos multiproteicos utilizan AL como cofactor: las α -oxoácido deshidrogenasas PDH y KGDH, y el CCG (Zhao y col., 2005). A continuación se exponen dichas vías, a modo introductorio de la diversidad de variantes encontradas en la naturaleza para cada una de las dos estrategias. Posteriormente se repasarán otros modelos relevantes.

1.2.4.1. Síntesis *de novo*

Intervienen dos enzimas: una *octanoiltransferasa*, LipB; y una *lipoato sintasa*, LipA. LipB transfiere un residuo octanoilo unido inicialmente a la proteína transportadora de grupos acilo (octanoil-ACP) –proveniente de la síntesis de ácidos grasos– a las subunidades E2 de los complejos α -OADH y a la proteína H del CCG (Jordan y Cronan, 1997, 2003); posteriormente LipA cataliza la inserción de dos átomos de azufre en los residuos octanoil-E2 u octanoil-H utilizando como dador de grupos sulfhidrilo S-adenosil-metionina (Miller y col., 2000). La Figura 1.8 muestra una representación esquemática de la vía.

Existen evidencias de que LipA podría, alternativamente, catalizar la inserción de grupos sulfhidrilos sobre octanoil-ACP formando lipoil-ACP; LipB luego transferiría el residuo lipoilo desde ACP a las subunidades E2/H (Jordan y Cronan, 2003; Hassan y Cronan, 2011). Por otro lado, se encontraron indicios de que tanto LipA como LipB formarían uniones fuertes no covalentes con los complejos PDH y KGDH (no así con CCG) a través de E2 (Hassan y Cronan, 2011).

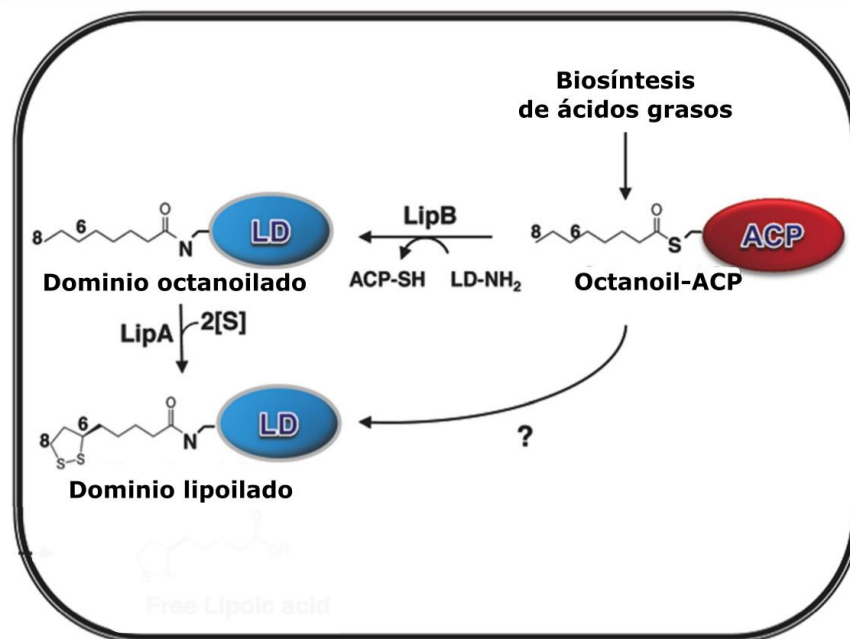


Figura 1.8. Vías de lipoilación en *E. coli*. de síntesis *de novo* de AL en *E. coli*. El signo de interrogación hace referencia a una potencial vía alternativa donde LipA catalizaría primero la formación de lipoil-ACP y LipB transferiría los residuos lipoilo desde ACP a E2 y H. (Adaptado de Hassan y Cronan, 2011).

1.2.4.2. Rescate o salvataje de ácido lipoico exógeno

Interviene una única enzima, LplA, de actividad *lipoato proteína ligasa*. Cataliza la activación y ligación de AL exógeno libre, presente en el medio ambiente, en una reacción de dos etapas dependiente de ATP (Figura 1.9). En primer lugar activa AL mediante la formación del intermediario lipoil-AMP (liberando PPi); posteriormente liga lipoato a las apoproteínas blanco facilitando el ataque nucleofílico del residuo conservado de lisina de E2 o H sobre el carboxilo del lipoato (liberando AMP) (Green y col., 1995).

Como ocurre con LipA y LipB, LplA es capaz de utilizar un sustrato alternativo, en este caso ácido octanoico libre, aunque con menor afinidad (Hermes y Cronan, 2009; Cronan, 2014). El octanoato así activado y ligado sería luego convertido en lipoato (lipoamida) por acción de LipA. Incluso se vio que LplA podría llegar a utilizar lipoato u octanoato unido a AMP, aunque muy pobremente (Morris y col., 1995).

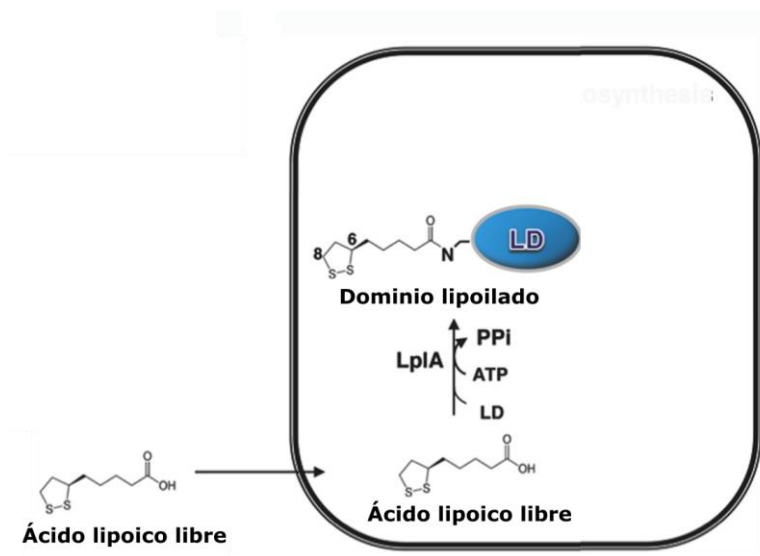


Figura 1.9. Vía de rescate o salvataje de AL libre en *E. coli*. (Adaptado de Hassan y Cronan, 2011).

1.2.4.3. Principales modelos

Dada la importancia de los múltiples metabolismos en los que intervienen los complejos enzimáticos que utilizan AL como cofactor, el interés por conocer los mecanismos de lipoilación utilizados por los diferentes organismos ha ido creciendo. Actualmente han logrado caracterizarse estos mecanismos, total o parcialmente, en diversos modelos procariotas y eucariotas; algunos de ellos patógenos para el ser humano. A continuación se describen algunos de los más relevantes en relación con esta tesis.

❖ *Bacillus subtilis*

B. subtilis es una bacteria Gram (+), y los cinco complejos multienzimáticos lipoilables se encuentran codificados en su genoma (Christensen y col., 2011). Al igual que *E. coli*, posee una octanoil transferasa (LipM), una lipoato sintasa (LipA) y una lipoato proteína ligasa (LplJ). Sin embargo, a diferencia de *E. coli*, estas proteínas no resultan ser suficientes para sintetizar o rescatar eficientemente AL (Martin y col., 2009), sino que necesita de una cuarta enzima conocida como LipL, de actividad *amidotransferasa*, que además estaría implicada en el salvataje de AL (Christensen y col., 2011).

En la síntesis *de novo* (Figura 1.10), LipM transfiere específicamente residuos octanoilos desde octanoil-ACP a la proteína H. LipL, a su vez, transfiere los grupos

octanoilos desde H a las subunidades E2. No está claro en qué etapa actúa LipA; podría ser antes o después de LipL, o incluso ambos casos (Christensen y col., 2011).

En la vía de salvataje (Figura 1.10), LpIJ cataliza una reacción clásica de lipoato protein ligasa análoga a la de LplA en *E.coli*. La única diferencia radica en que necesita de la acción facilitadora de LipL para ser eficiente, dada su baja afinidad por las subunidades E2 de PDH y BCDH (Martin y col., 2011); incluso Christensen y col. (2011) observaron que la presencia de H (además de LipL) sería necesaria para que LpIJ pueda lipoilar E2 de PDH.

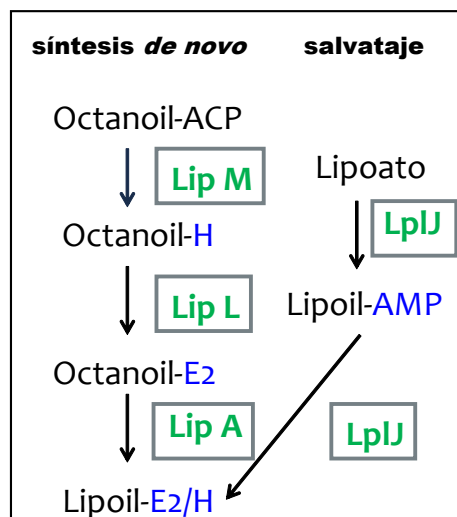


Figura 1.10. Mecanismos de lipoilación en *B. subtilis*. El salvataje de AL exógeno es catalizado por una lipoato protein ligasa (LpIJ), al igual que en *E. coli*, aunque requeriría la presencia de una segunda enzima, LipL, para aumentar su efectividad.

Es mucho menos lo que se sabe sobre los mecanismos de lipoilación en eucariotas. Enzimas homólogas a las de *E. coli* han sido encontradas en hongos, plantas, protistas y mamíferos, pero muchos detalles mecanísticos siguen sin esclarecerse (Schonauer y col., 2009; Hiltunen y col., 2010); además podrían intervenir actividades enzimáticas nuevas (Hermes y Cronan, 2013). Una diferencia fundamental es que las proteínas lipoilables son de ubicación mitocondrial (y en algunos casos, plastídica), y por ende, la síntesis *de novo* y/o el salvataje de AL ocurren en estas organelas (Cronan, 2016).

❖ *S. cerevisiae*

Uno de los organismos mejor estudiados es *S. cerevisiae*. Esta levadura posee tres complejos lipoilables: PDH, KGDH y CCG; no tendría vía de salvataje y en su vía de síntesis compartiría algunas características con *B. subtilis* (Schonauer y col., 2009; Cronan, 2016). Nuevamente, el sustrato inicial es el octanoil-ACP proveniente de la síntesis mitocondrial de ácidos grasos (FAS II, del inglés: *fatty acid synthesis* II), que es transferido por una *octanoiltransferasa*, Lip2 (Marvin y col., 2001), desde ACP a la proteína H del CCG. Luego una *lipoato sintasa*, Lip5 (Sulo y Martin, 1993), cataliza la inserción en el residuo octanoilo (unido a H) de dos átomos de azufre para formar los grupos sulfhidrilos o tioles del lipoato, que permanece unido a H. En este punto, una tercera enzima es necesaria para transferir lipoato a las subunidades E2 de α -OADHs, como ocurre en *B. subtilis*. Esta enzima sería Lip3 (Schonauer y col., 2009; Cronan, 2016), que poseería actividad amidotransferasa –como LipL en *B. subtilis*– y transferiría el precursor octanoato desde octanoil-H a las subunidades E2 de las α -OADHs correspondientes (Hiltunen y col., 2010; Cronan, 2016) (Figura 1.11A). También se ha postulado que Lip3 podría ser una *octanoil-CoA:proteína transferasa* (Hermes y Cronan, 2013). En este último modelo (Figura 1.11B), una vez que todas las proteínas H han sido octanoiladas, el exceso de octanoato (unido a ACP) se acumularía y sería utilizado por una acil-ACP:CoA transferasa para formar el intermediario octanoil-CoA; finalmente sería transferido a las E2 por la actividad octanoil-CoA:proteína transferasa de Lip3 (Hermes y Cronan, 2013). Lip5 sería la encargada de añadir los átomos de azufre formando los grupos tioles del lipoato.

Una novedosa e interesante relación entre la síntesis de AL y la regulación de la expresión génica mitocondrial vía procesamiento de ARNts ha sido sugerida (Sulo y Martin, 1993; Schonauer y col, 2009; Hermes y Cronan, 2013).

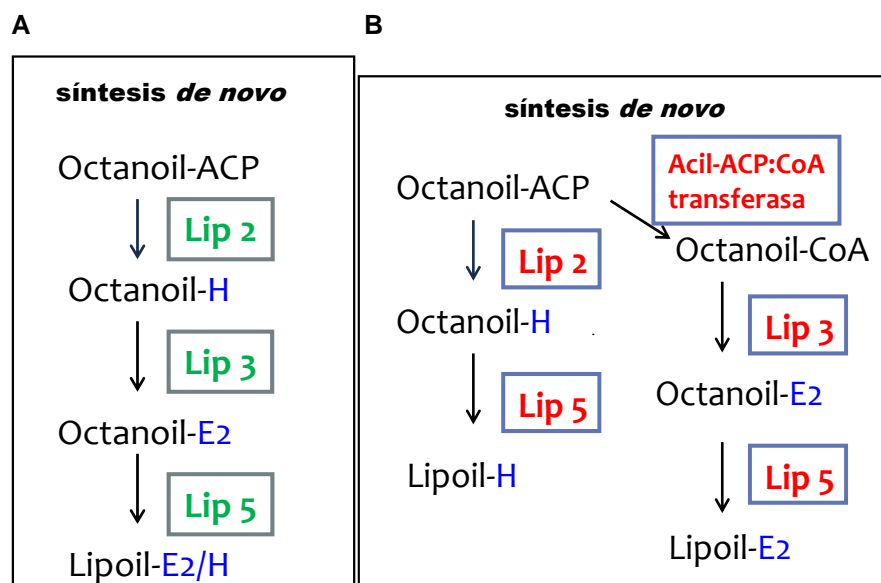


Figura 1.11. Mecanismos propuestos para la síntesis *de novo* de AL en *S. cerevisiae*. **A.** Lip3 actuaría como aminotransferasa. **B.** Lip3 actuaría como octanoil-CoA:proteína transferasa.

❖ *Plasmodium falciparum*

Es un protozoo parásito intracelular y la especie más virulenta del género *Plasmodium* causante de la enfermedad conocida como Malaria o paludismo (Günter y col., 2009). Posee una organela especial, el apicoplasto, característica de los protozoos apicomplejos, donde se llevan adelante parte de los procesos de lipoilación de proteínas. Cuatro son sus complejos multienzimáticos lipoilados: PDH, KGDH, BHDH y CCG (Spalding y Prigge, 2010).

La síntesis *de novo* de AL está confinada al apicoplasto, y tiene como finalidad lipoilar la enzima PDH que es plastídica (Storm y Müller, 2012). Participan la *octanoiltransferasa* LipB y la *lipoato sintasa* LipA, según lo descripto previamente. AL libre no puede ingresar a la organela y es utilizado exclusivamente para la lipoilación de las α -OADHs y CCG mitocondriales mediante la ruta de salvataje, en la que intervienen dos lipoato proteína ligasas, LplA1 y LplA2 (Wrenger y Müller, 2004; Günter y col., 2009). En la Figura 1.12 se ilustran los mecanismos descriptos.

Cabe destacar que LplA2 se encuentra tanto en mitocondria como en apicoplasto durante la etapa de desarrollo intraeritrocítico, y es capaz de catalizar la reacción de LipB, utilizando octanoil-ACP como sustrato, aunque con menor afinidad. No está claro cómo los estadios intracelulares obtienen AL libre de las células hospedadoras (Günter y col., 2009).

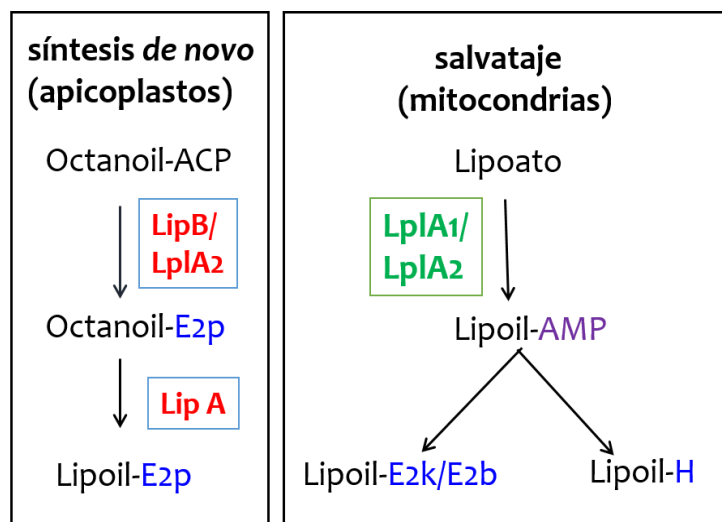


Figura 1.12. Mecanismos de lipoilación de proteínas en *P. falciparum* y su correspondiente compartimentalización.

❖ *Homo sapiens*

De particular relevancia resulta el metabolismo de AL en nuestra especie. Como se mencionó con anterioridad, inicialmente se pensaba que AL era una vitamina perteneciente al complejo B (Bilska y Wlodek, 2005). Estudios posteriores revelaron no sólo que AL es sintetizado *de novo* en mamíferos sino que sería esencial para la supervivencia en los primeros estadios del desarrollo embrionario (Yi y Maeda, 2005). Además del CCG y los tres complejos α -cetoácido deshidrogenas canónicos, *H. sapiens* posee una 2-oxoadipato deshidrogenasa, también lipoilada, que interviene en la degradación de la lisina (Mayr y col., 2014).

La lipoilación de proteínas blanco ocurre en las mitocondrias, como en el resto de los eucariotas (Soreze y col., 2013; Mayr y col., 2014) (Figura 1.13). Una *lipoil transferasa* (LIPT1) catalizaría la ligación de lipoato, previamente activado como lipoil-GMP, a las subunidades E2 y H (Fujiwara y col., 1999). Esta enzima, carece de la capacidad de activar el lipoato por unión a GMP, por lo que se postula la existencia de una *enzima activadora de lipoato* (LAE, del inglés: *lipoate activating enzyme*), hasta ahora sólo purificada y caracterizada parcialmente en bovinos (Fujiwara y col., 1997). En algunos organismos esta actividad se encuentra en el extremo C-terminal de una única lipoato proteína ligasa (como LpIA, en *E. coli*); en otros, se encuentra en una proteína separada (como LAE, en mamíferos, y LpIB en la bacteria *Thermoplasma acidophilum*) (Christensen y Cronan, 2009). No obstante, Cronan (2016) postula que la

actividad ligasa de LIPT1 sería residual, producto de sus orígenes evolutivos y carente de relevancia *in vivo*.

En la vía de síntesis (Figura 1.13), una *octanoiltransferasa* (LIPT2) transfiere residuos octanoilo desde octanoil-ACP a la proteína H y posteriormente una *lipoato sintasa* (LIAS, del inglés: *lipoic acid synthetase*) cataliza la inserción de los átomos de azufre (Soreze y col., 2013; Mayr y col., 2014). Llegado a este punto, se plantea que la misma LIPT1 actuaría de forma análoga a Lip3 en levaduras, octanoilando E2 mediante una actividad *octanoil-CoA:proteín transferasa* (Mayr y col., 2014) o *amidotransferasa* (Cronan, 2016); otra hipótesis es que LIPT2 sería capaz de lipoilar indistintamente tanto H como E2 (Soreze y col., 2013).

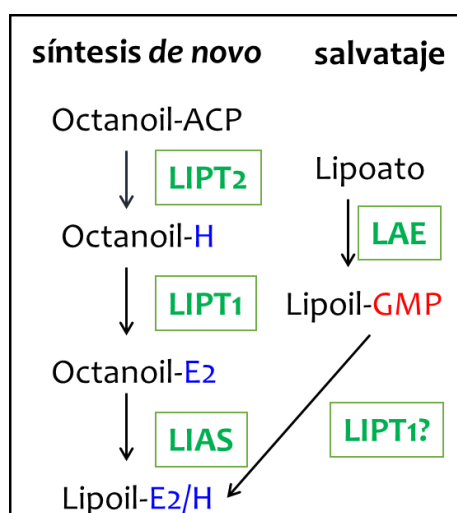


Figura 1.13. Mecanismos de lipoilación en *H. sapiens*. LIPT1 podría jugar un papel tanto en el salvataje de AL exógeno como en la síntesis de novo. En este último caso, se especula que actuaría como octanoil-CoA:proteína transferasa o como amidotransferasa.

1.2.5. Enzimas involucradas en la biosíntesis de ácido lipoico

1.2.5.1. Lipoato sintasa

Es miembro de una súper familia de metalo-proteínas conocidas como enzimas radical S-adenosil-metionina que catalizan una amplia variedad de reacciones bioquímicas (Wang y Frey, 2007; Jarrett, 2014). Lipoato sintasa, también conocida como LIAS, es una enzima altamente conservada tanto en procariotas como en eucariotas (Lu y col., 2014) encargada de insertar dos átomos de azufre a los residuos octanoilos de E2 y H formando así grupos lipoilos; el cofactor lipoamida es generado *on site* (Cicchillo y Booker, 2005). Es una proteína monomérica y cada polipéptido posee

dos centros $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$, uno canónico y otro auxiliar, siendo este último el dador de átomos de azufre (Wang y Frey, 2007; Cronan, 2014; Jarrett, 2014). LIAS utiliza el centro canónico $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ para fragmentar reductivamente S-adenosil-metionina (SAM) en L-metionina y el radical 5'-desoxiadenosilo (Cicchillo y Booker, 2005; Jarret, 2014). Este radical posee mucha energía e inicia la catálisis sustrayendo el hidrógeno de C6, formándose un radical carbonilo que ataca uno de los azufres del centro auxiliar $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$, incorporándolo así en C6. El mismo mecanismo se utiliza para la inserción del segundo azufre en C8, fragmentando una segunda molécula de SAM (Douglas y col., 2006; Cronan, 2014). Consistentemente, se observó que para la síntesis de un grupo lipoilo se necesitan dos moléculas de SAM (Cicchillo y Booker, 2005).

Cada polipéptido cataliza la inserción de ambos átomos de azufre, en contraposición a la hipótesis de que cada azufre sería insertado por un polipéptido diferente (Cicchillo y Booker, 2005). La inserción de los dos azufres ocurre con la inversión en la configuración del C6 (Sulo y Martin, 1993).

1.2.5.2. Octanoiltransferasa

Su nombre completo es *octanoil-ACP:proteína N-octanoiltransferasa*. Cataliza la transferencia del grupo octanoilo desde la proteína transportadora de grupos acilo a los dominios lipoilables; también se la conoce como *octanoil(lipoil)transferasa*, dada su capacidad para transferir alternativamente residuos lipoilos (Jordan y Cronan, 2003). Utiliza un mecanismo de dos pasos: a) octanoato es primero transferido desde ACP (donde forma un enlace tioéster) a LipB, formándose un *intermediario acil-enzima* a través de un nuevo enlace tioéster (con el residuo cisteína 169); b) este enlace es luego atacado por el grupo ϵ -amino de la lisina del dominio lipoilable, quedando el octanoilo unido por enlace amida, listo para la inserción de sulfuros (Zhao y col., 2005).

LipB utiliza la energía del enlace tioéster entre el octanoato y el brazo pantotenato de ACP para generar el enlace entre octanoato y la apoproteína (E2 o H). LipB es altamente específica para este enlace tioéster y es incapaz de transferir a las apoproteínas AL rescatado. Estructuras cristalográficas sugieren que LipB sería una lisin/cistein transferasa (Günter y col., 2009).

El intermediario de reacción octanoil-LipB también transfiere el grupo octanoilo a la proteína ACP (ACP-SH), aunque en una proporción pequeña; el equilibrio está desplazado hacia octanoil-LipB (Zhao y col., 2005).

1.2.5.3. Lipoato proteína ligasa

Es la enzima encargada de rescatar AL libre del medio, a través de un mecanismo de dos pasos (Morris y col., 1995; Fujiwara y col., 2010). En el primero cataliza, utilizando ATP (o GTP), la formación del intermediario lipoil-AMP (o lipoil-GMP); de esta manera se activa el grupo carboxilo del lipoato mediante la formación de un enlace fosfoéster. En el segundo paso, el grupo amino de un residuo de lisina conservado en el dominio lipoilable (DL) reacciona con el carboxilo activado formando el enlace lipoamida que mantendrá unido al cofactor (Morris y col., 1995; Rock, 2009).

LplA de *E. coli* también es capaz de activar –aunque con menor afinidad– octanoato (y análogos de lipoato), que se encuentra en bajas concentraciones en el interior celular (Green y col., 1995; Rock, 2009).

Las lipoato proteína ligasas poseen dos dominios, uno de los cuales puede aparecer como una proteína independiente, como es el caso de LplB en *Th. acidophilum* y es necesario para la formación del intermediario lipoil-AMP (adenilación). Dicho dominio posee un bolsillo bilobular; en un lóbulo hidrofóbico se ubica el grupo lipoilo, y en el otro, polar, se ubica el AMP, que interactúa con los residuos del entorno a través de puentes hidrógeno; dicha disposición favorece el ataque nucleofílico de la lisina sobre el grupo carboxilo del lipoato (Fujiwara y col., 2010). El otro dominio cataliza la ligación del lipoato activado a las subunidades E2 y H (Fujiwara y col., 2010; Cronan, 2016).

Conforman junto con las octanoiltransferasas (e incluso junto con las enzimas que catalizan la ligación de biotina) una superfamilia (Pfam PF03099) que habría evolucionado a partir de un antecesor común (Reche, 2000). Si bien el grado de similitud de secuencias es bajo, poseen un residuo de lisina absolutamente conservado, y similitudes estructurales considerables, incluyendo un patrón de plegamiento conservado (Reche, 2000; Christensen y col., 2011).

1.2.5.4. Amidotransferasa

La primera enzima con actividad amidotransferasa fue descrita recientemente en *B. subtilis* (LipL; Christensen y col., 2011). El grupo tiol de la cisteína del sitio activo de LipL atacaría el enlace lipoamida (entre el grupo octanoilo y la lisina) de la proteína H, formando un intermediario octanoil-S-LipL. Posteriormente transferiría el grupo octanoilo a E2 formando un nuevo enlace lipoamida. Se demostró la transferencia de octanoilos desde H a cada E2, y también, reversiblemente, a LipL.

Análisis filogenéticos muestran que LipL posee cierta homología secuencial que permitiría ubicarla en una ramificación de las lipoato proteína ligasas (Christensen y col., 2011; Cronan, 2016). También muestra una estrecha relación con LipM, miembro del clado de las octanoiltransferasas, que se ramificaron más tarde de la misma familia principal de lipoato ligasas. La posición del residuo catalítico de cisteína (C150) es muy similar en ambas enzimas. Análisis estructurales indican que LipM y LipL habrían convergido mecanísticamente dentro de sus sitios activos utilizando el mismo plegamiento.

1.2.5.5. Lipoamidasa

Hasta la fecha sólo ha sido identificada una enzima que catalice la ruptura o clivaje específico de los enlaces lipoamida de los complejos multienzimáticos y se conoce como *lipoamidasa* (Lpa). Originalmente descubierta en la bacteria patógena *Enterococcus faecalis* (por entonces, *Streptococcus faecalis*) (Suzuki y Reed, 1963) y recientemente caracterizada, se trata de una proteína de 80 kDa, con un dominio amidasa N-terminal donde se encuentra la tríada catalítica Ser-Ser-Lis, característica de la familia de amidohidrolasas; posee además un dominio C-terminal de función desconocida (Jiang y Cronan, 2005).

Se cree que Lpa en *En. faecalis* formaría parte de la vía de salvataje de AL ya que uno de los productos de la reacción lipoamidasa es AL con el grupo carboxilo libre, que puede ser posteriormente activado y ligado por las lipoato proteína ligasas de la bacteria. *In vitro* es capaz de utilizar como sustrato tanto dominios lipoilados, como proteínas α -OADH enteras y péptidos más pequeños; sin embargo, se cree que fisiológicamente los sustratos relevantes serían los péptidos producidos por la acción de proteasas (Jiang y Cronan, 2005). Su actividad también ha sido demostrada *in vivo* en sistemas heterólogos (*E. coli*) (Spalding y Prigge, 2009).

La actividad lipoamidasa ha sido también observada en otros organismos como *Listeria monocytogenes* (Christensen y col., 2011) y mamíferos, incluyendo al humano (Wang y col., 2011). No obstante, en este último caso, la actividad lipoamidasa encontrada no sería específica para el lipoato y podría atribuirse a otro tipo de enzimas como la biotidinasas y la colesterol esterasa (Spalding y Prigge, 2010).

En los mamíferos, AL libre también puede ser obtenido a partir de la hidrólisis ácida que ocurre en el intestino. De hecho, se piensa que esta sería la principal fuente de AL libre en animales, que satisfacen parte de sus requerimientos de AL a través de la dieta y las bacterias intestinales (Spalding y Prigge, 2010).

1.2.6. Biosíntesis de ácido lipoico en tripanosomas

1.2.6.1. Conocimientos previos

La comparación de los genomas de *T. cruzi* y *T. brucei* y *Leishmania major* muestra que los tres patógenos poseen esencialmente los mismos contenidos y ordenamientos génicos, como así también procesos biológicos (El-Sayed y col., 2005). Estas similitudes se extenderían al metabolismo de AL (Spalding y Prigge, 2010), poseyendo secuencias ortólogas para lipoato sintetasas, octanoiltransferasas y enzimas con homología a lipoato proteína ligasas, aunque en ningún caso han sido caracterizadas. Sí se sabe que los tripanosomas son capaces de sintetizar ácido octanoico, precursor de AL, en mitocondrias (Lee y col., 2007) y se han estudiado parcialmente los cuatro complejos lipoilados que poseen: PDH, KGDH, BCDH y CCG (Spalding y Prigge, 2010).

En *T. brucei*, la expresión de los complejos lipoilados varía durante el ciclo de vida. En ambas formas del parásito, PCF y BSF, la lipoilación de proteínas tendría lugar en la mitocondria, aunque ésta y su metabolismo varían en los distintos estadios (Spalding y Prigge, 2010). En BSF la principal fuente de energía es la glucosa sanguínea, que oxidan vía glucólisis, y carecen de una cadena respiratoria mitocondrial funcional; la estructura de la mitocondria es rudimentaria, careciendo de crestas, y su metabolismo es reducido. Por el contrario, PCF se alimenta principalmente de los aminoácidos treonina y prolina presentes en el intestino del insecto vector y posee una mitocondria completamente desarrollada y activa, con una cadena respiratoria

funcional, aunque no esencial (Tyler y col., 1997; Roldán y col., 2011). Las actividades de las enzimas del ciclo de Krebs como KGDH, aumentan significativamente al pasar el parásito del estadio BSF al PCF (Spalding y Prigge, 2010).

Curiosamente, se ha encontrado que BSF expresa la subunidad E3 de los complejos α -OADH, también conocida como (*dihidro*)lipoamida deshidrogenasa (Tyler y col., 1997; Roldán y col., 2011). Aunque se desconoce su función en estas condiciones, se piensa que E3 es importante para el crecimiento de BSF, ya que es blanco –junto con la tripanotión reductasa– de varios inhibidores utilizados en el tratamiento de la tripanosomiasis africana (Spalding y Prigge, 2010). Otro dato importante es que tanto en BSF como en PCF se detecta una proteína lipoilada de 40 kDa no identificada hasta el momento y de función desconocida (Stephens y col., 2007). Más aún, utilizando una cepa mutante para ACP, incapaz de lipoilar sus proteínas blanco, no lograron restaurar la lipoilación de esta proteína de 40 kDa al suplementar el medio con lipoato y octanoato libres (Stephens y col., 2007). Estos resultados indican que *T. brucei* carecería de una vía de rescate de AL libre, pese a codificar en su genoma una proteína con homología a lipoato proteína ligasas, tal como ocurre en levaduras (Schonauer y col., 2009; Hermes y Cronan, 2013).

En contraste, *T. cruzi* depende, en todos los estadios de su ciclo de vida, de una mitocondria completamente funcional para generar energía (Tyler y col., 1997). Los mecanismos y el patrón de lipoilación de sus proteínas tampoco han sido estudiados, pero al igual que en *T. brucei*, se postula a la dihidrolipoamida deshidrogenasa (E3) como un buen blanco quimioterapéutico dado que, entre otros motivos, promueve la formación de anión superóxido y peróxido de hidrógeno por reducción de nifurtimox, una de las drogas utilizadas en el tratamiento del Mal de Chagas y recientemente, como tratamiento experimental de la enfermedad del sueño (Krauth-Siegel y Schöneck, 1995; Roldán y col., 2011).

1.2.6.2. Importancia como potencial blanco quimioterapéutico

Como se describió al comienzo de esta introducción, AL cumple múltiples funciones, tanto en su forma libre como unida a proteínas. Estas funciones van desde la regulación del medio redox en las células, la regeneración de otros antioxidantes celulares, la eliminación de especies reactivas del oxígeno, la participación como

cofactor de importantes complejos multienzimáticos que intervienen en la generación de energía, la formación de sustratos para la síntesis de aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos y hasta de isoprenoides y grupos hemo.

Dada la multiplicidad y esencialidad de los metabolismos en los que interviene, la biosíntesis de AL y los mecanismos de lipoilación de proteínas representan un potencial blanco quimioterapéutico de efecto altamente pleiotrópico contra las enfermedades generadas por tripanosomas. A este respecto, existen antecedentes alentadores sobre el efecto inhibitorio del análogo estructural de AL conocido como 8-bromo-octanoato, en parásitos humanos como *Toxoplasma gondii* (Crawford y col., 2006) y *Plasmodium falciparum* (Allary y col., 2007; Storm y Müller, 2012).

2. Objetivos

2.1. Objetivos generales

- i) Validar el metabolismo de lipoilación de proteínas en *Trypanosoma cruzi* como potencial blanco quimioterapéutico de efecto altamente pleiotrópico.
- ii) Identificar y caracterizar las enzimas involucradas en dicho metabolismo.
- iii) Proponer un modelo para la vía de síntesis *de novo* de AL en tripanosomas.

2.2. Objetivos específicos

- Describir el patrón de lipoilación de proteínas de *T. cruzi* en su estadio epimastigote.
- Determinar el efecto de análogos de AL sobre el crecimiento, patrón de lipoilación y actividad enzimática oxoácido deshidrogenasa en cultivos de *T. cruzi* epimastigotes.
- Confirmar la inexistencia de la vía de salvataje de lipoato en *T. cruzi*.
- Confirmar mediante análisis bioinformático la existencia de secuencias codificantes de enzimas putativas para la síntesis *de novo* de AL en tripanosomátidos.
- Analizar bioinformáticamente y predecir la estructura y función de las distintas proteínas encontradas en *T. brucei*.
- Caracterizar funcionalmente las enzimas encontradas.
- Proponer un modelo para la vía de síntesis *de novo* de AL en tripanosomas.

3. Materiales y Métodos

3.1. Cepas y plásmidos

Las cepas de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* y los plásmidos más relevantes utilizados en esta tesis se detallan a continuación:

Tabla 3.I. Cepas utilizadas en el desarrollo de esta tesis.

Cepas	Genotipos	Referencias
<i>E. coli</i>		
DH5α	F- Δ lacU169 (Φ 80lacZΔM15) <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (rk - mk+) <i>deoR supE44 thi-1 λ- gyrA96 relA1</i>	Hanahan, 1983
TM131	<i>rpsL lipA150::Tn1000dKn lplA148::Tn10dTc</i> Km ^r Tc ^r	Morris y col., 1994
TM136	<i>rpsL lipB182::Tn1000dKn lplA148::Tn10dTc</i> Km ^r Tc ^r	Morris y col., 1994
TM131- <i>Tb lipL</i>		Esta tesis
TM136- <i>Tb lipT</i>		Esta tesis
TM136- <i>Tb lipL</i>		Esta tesis
<i>S. cerevisiae</i>		
BY4741	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i>	EUROSCARF
<i>lip2</i>	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, lip2::kanMX4</i>	Schonauer y col., 2009
<i>lip3</i>	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, lip3::kanMX4</i>	Schonauer y col., 2009
<i>lip2-Tb lipT</i>		Esta tesis
<i>lip2-Tb lipL</i>		Esta tesis
<i>lip3-Tb lipT</i>		Esta tesis
<i>lip3-Tb lipL</i>		Esta tesis

Tabla 3. II. Vectores y construcciones plasmídicas más relevantes utilizados en esta tesis.

Plásmido	Descripción	Referencias
<i>E. coli</i>		
pCR-Blunt II-TOPO	Vector para clonado de productos de PCR de extremos romos. Km ^r	Invitrogen
pBluescript II KS	Vector para clonado de productos de PCR y expresión de proteínas recombinantes bajo el control del promotor lac. Ap ^r	Stratagene
pBluescript- <i>Tb lipT</i>	Vector para la expresión del gen Tb11.01.1160, octanoil transferasa putativa de <i>T. brucei</i>	Esta tesis
pBluescript- <i>Tb lipL</i>	Construcción para la expresión del gen Tb927.8.630, enzima putativa con homología a lipoato protein ligasas de <i>T. brucei</i>	Esta tesis

<i>S. cerevisiae</i>		
p426 GPD	Vector de expresión de proteínas recombinantes bajo el control del promotor constitutivo GPD. Marcador de selección <i>URA3</i> . Ap ^r	Mumberg y col., 1995
p426- <i>TbIipT</i>	Construcción para la expresión del gen Tb11.01.1160, octanoil transferasa putativa de <i>T. brucei</i>	Esta tesis
p426- <i>TbIipL</i>	Construcción para la expresión del gen Tb927.8.630, enzima putativa con homología a lipoato protein ligasas de <i>T. brucei</i>	Esta tesis

3.2 Medios de cultivo

3.2.1. Medios de cultivo para *E. coli*

❖ Luria Bertani (LB)

Peptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O	c.s.p. 1 l

Utilizado para mantenimiento de cepas y selección de transformantes (adicionando antibiótico según corresponda). En el caso de las cepas TM131 y TM136 se suplementó con glucosa 2%, succinato de sodio 0,5 mM y acetato de sodio 0,5 mM.

❖ Medio mínimo M9

Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	12,8 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	0,5 g
NH ₄ Cl	1 g
H ₂ O	c.s.p. 1 l

Se autoclava y se suplementa, por cada 100 ml, con:

MgSO ₄ 1 M	0,2 ml
CaCl ₂ 100 mM	0,1 ml
Glucosa 20% p/v	1 ml

Utilizado para experimentos de reversión de fenotipo de las cepas TM131 y TM136.

3.2.2. Medios de cultivo para *S. cerevisiae*

❖ Medio rico YPD

Peptona	2% p/v
Extracto de levadura	1% p/v
Glucosa	2%

Utilizado para mantenimiento de cepas salvajes y mutantes sin complementar.

❖ Medio rico YP

Peptona	2% p/v
Extracto de levadura	1% p/v
Fuente de carbono	3%

Utilizado para experimentos de reversión de fenotipo de las cepas *lip2* y *lip3*. Las fuentes de carbono utilizadas fueron: glicerol (YPG), succinato (YPS) y etanol (YPE).

❖ Medio mínimo YNBD

YNB sin aminoácidos	0,67% p/v
Glucosa	2% p/v

Utilizado para selección de transformantes y mantenimientos de cepas transformantes positivas. YNB: *yeast nitrogen base*.

Debe suplementarse con aminoácidos (concentración final 0,5 g/l) que suplan auxotrofías de las cepas utilizadas, con excepción de la prototrofia conferida por plásmido en transformantes positivas. En nuestro caso se suplementó con: leucina, isoleucina, metionina, adenina, valina y triptófano. El vector p426 GPD (con y sin inserto) utilizado en esta tesis confiere la capacidad de sintetizar uracilo.

❖ Medio mínimo YNB DGly

YNB sin aminoácidos ni NH_4SO_4	0,67% p/v
Glucosa	2% p/v
Glicina	1,5% p/v

Utilizado para experimentos de reversión de fenotipo de las cepas *lip2* y *lip3*.

Suplementado con los mismos aminoácidos que el medio YNBD.

3.2.3. Medios de cultivo para *T. cruzi*

❖ *Liver Infusion Tryptose (LIT)*

Infusión de hígado	33 g/l
Triptosa	3 g/l
Na ₂ HPO ₄ anhidro	3,2 g/l
KCl	0,4 g/l
Glucosa	4 g/l
Hemina (Sigma)	1 ml/l
Penicilina	100 U/ml
Estreptomicina	100 µg/ml
SFB descomplementado	10% v/v

Utilizado para mantenimiento de cepas y ensayos de inhibición de crecimiento. SFB: suero fetal bovino.

❖ *Liver Infusion Tryptose modificado (mLIT)*

Posee la misma composición que el medio LIT, pero con menor concentración de glucosa (0,4 g/l).

Utilizado para estudiar el efecto de la baja concentración de glucosa sobre el crecimiento y el metabolismo del ácido lipoico del parásito.

3.3. Soluciones

❖ *PBS 10X (Phosphate saline buffer)*

NaCl	8 g/l
KCl	0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	1,44 g/l
KH ₂ PO ₄	0,24 g/l

Llevar a pH 7,5 con HCl concentrado.

❖ TAE 50X

Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57,1 ml
EDTA 0,5 M (pH 8)	100 ml

❖ Buffer de lisis alcalina

Tris-HCl pH 8	10 mM
EDTA	1 mM
Sacarosa	15% p/v
Lisozima	2 mg/ml
ARNsa pancreática	0,2 mg/ml
ASB	0,1 mg/ml

Antes de agregarse, la ARNsa pancreática se calienta a 100°C durante 15 minutos para inactivar la actividad ADNsa de la misma.

❖ Solución TSS

LB	2,125 g
PEG	10 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O 1 M	5 ml

❖ Buffer de extracción de proteínas de levadura

Tris-HCl pH 7,5	20 mM
NaCl	50 mM
MgCl ₂	10 mM

❖ Buffer de electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) 10 X

Tris pH 8,3	250 mM
Glicina	144 mM
SDS	10% p/v

❖ Solución de transferencia para *western blot*

Tris pH 8,3	25 mM
Glicina	192 mM
Metanol	20% v/v

3.4. Condiciones de crecimiento

3.4.1. Cultivos de *E. coli* en medio líquido

Las cepas bacterianas se inocularon desde medio sólido, partiendo de una absorbancia inicial (DO_{600nm}) de aproximadamente 0,01. Para permitir una correcta oxigenación de los cultivos, el volumen de medio líquido en ningún caso superó la quinta parte de su recipiente. Dependiendo del caso, los cultivos crecidos durante toda la noche fueron diluidos con medio fresco a $DO_{600nm} = 0,1$ o cosechados por centrifugación.

Cuando fue necesario, los medios fueron suplementados con 100 µg/ml de ampicilina, kanamicina 25 o 50 µg/ml y tetraciclina 10 o 12 µg/ml. La incubación se realizó en baños termostatzados a 37°C y agitación vigorosa (250 rpm).

3.4.2. Cultivos de *S. cerevisiae* en medio líquido

Las cepas de levaduras se inocularon desde medio sólido, partiendo de una absorbancia inicial (DO_{600nm}) de aproximadamente 0,01. Para permitir una correcta oxigenación de los cultivos, el volumen de medio líquido en ningún caso superó la quinta parte de su recipiente.

La cepa salvaje BY4741 y las mutantes *lip2* y *lip3* se crecieron en medio rico YPD, o bien, en medio mínimo YNBD suplementado con adenina, histidina, lisina, leucina, metionina y triptofano, para seleccionar transformantes (mediante la capacidad de complementar la auxotrofía de uracilo conferida por el vector p426 GPD y sus derivados). Las cepas mutantes transformantes también se crecieron en medio mínimo YNBD para mantener la presión de selección (carencia de uracilo).

La incubación se realizó en baños termostatzados a 30°C y agitación de 200 rpm.

3.4.3. Cultivos de *T. cruzi* en medio líquido

Se utilizaron cultivos de epimastigotes de las cepas CL Brener y Dm28c para los ensayos de transporte de octanoato, inhibición de crecimiento, y extracción de proteínas para mediciones de actividad enzimática y western blot. Las cepas fueron cultivadas en medio LIT (y en algunos casos, mLIT) a 28 °C, sin agitación. La cepa CL Brener fue empleada en el proyecto genoma de *T. cruzi* y posee un genoma con una ploidia entre 2 y 3 (El-Sayed *et al.* 2005). De acuerdo con una clasificación que agrupa las poblaciones de *T. cruzi* en dos linajes filogenéticamente divergentes (basada en marcadores moleculares), CL Brener pertenece al grupo II, mientras que Dm28c al grupo I (Souto y col., 1996; Zingales y col., 1998)

3.5. Análisis bioinformático

Las secuencias génicas de interés para esta tesis fueron identificadas mediante búsquedas de tipo BLASTP en los proyectos genoma de los distintos tripanosomátidos (<http://www.tritrypdb.org/tritrypdb/>) utilizando como semilla las secuencias proteicas de las enzimas involucradas en las vías de síntesis *de novo* y/o salvataje de AL en *E.coli* y *S. cerevisiae*.

Las secuencias encontradas coincidieron con aquellas reportadas en la bibliografía (Spalding y Prigge, 2010). Se utilizaron para el diseño de oligonucleótidos que permitieran su amplificación por PCR, y como semilla en BLASTP globales que permitieron la construcción de árboles filogenéticos mediante el programa MEGA7. Además se analizó y comparó el grado de identidad y filogenia con respecto a los distintos modelos conocidos, utilizando el programa *MegAlign* de Lasergene.

Se utilizó la aplicación *online* MitoProt II (<https://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>; Claros, 1995) para predecir localización mitocondrial de las proteínas putativas codificadas por las secuencias de interés, y el programa Swiss-Model del sitio EXPASY (<http://swissmodel.expasy.org/>) para predecir estructura y función de dichas proteínas en base a comparaciones con estructuras obtenidas por cristalografía de rayos X de proteínas conocidas.

Un análisis comparativo de secuencias aminoacídicas entre tripanosomas y distintos organismos modelo se realizó mediante el software CLC Sequence Viewer 6.

3.6. Amplificación de ADN por PCR

Las secuencias génicas de interés se amplificaron para su ulterior clonado en el vector de interés mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (*Polimersase Chain Reaction*).

Se utilizaron volúmenes finales de 50 µl y la siguiente mezcla de reacción:

Buffer de amplificación	1 X
MgCl ₂	2,5 mM
dNTPs	5 µM cada uno (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
Oligonucleótidos	10 pmoles
Taq polimerasa	1 U
ADN molde	10 ng de ADN plásmidico o 70 ng de ADN genómico
H ₂ O _(d)	c.s.p. 50 µl

El protocolo estándar de amplificación utilizado se describe a continuación:

1. *Desnaturalización* del ADN por calentamiento a 94°C durante 5 minutos.
2. *Ciclado* (por lo general, 35 ciclos):
 - i. *desnaturalización*: 30 segundos a 94°C.
 - ii. *hibridación de oligonucleótidos*: 45 segundos a 56-60 °C; la temperatura depende de la extensión y composición de los mismos.
 - iii. *elongación*: 60-90 segundos a 72°C; el tiempo de elongación depende del tamaño del inserto a amplificar, y se calcula a razón de 1 minuto por cada kpb.
3. *Extensión final*: 10 minutos a 72°C.

Los productos de las amplificaciones fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa.

Para los clonados se utilizó la ADN polimerasa *Pfx50* (Invitrogen) que posee una mayor fidelidad debida a su actividad *proof-reading*. La temperatura de elongación con esta enzima es de 68°C. El tiempo de elongación se estimó en 1 minuto/ciclo/1000 pares de bases.

3.7. PCR de colonias en *E. coli*

Para detectar la presencia de inserto en los vectores de clonado o expresión, así como la presencia de dicho vector con inserto en el clon transformante, se utilizó como ADN molde una alícuota de una colonia estriada en una placa de cultivo que se resuspendió directamente en la mezcla de reacción de PCR en un volumen final de 25 μ l.

3.8. PCR de colonias en *S. cerevisiae*

Con la misma finalidad del apartado anterior, se tomó una alícuota de una colonia estriada en placa de cultivo y se la resuspendió en un tubo eppendorf conteniendo 50 μ l de NaOH 10 mM. Se calentó en microondas durante 5 minutos y se emplearon 3 μ l de la suspensión resultante como ADN molde la reacción de PCR (volumen final = 50 μ l).

3.9. Electroforesis de ADN

Se utilizaron geles de agarosa 0,8% p/v preparados en buffer TAE 0,5X, con el agregado de bromuro de etidio 0,4 μ g/ml que permitió la visualización de ácidos nucleicos por exposición a luz ultravioleta. Se empleó el sistema submarino (Sambrock y col., 1989). El buffer de corrida fue TAE 0,5X y se aplicó una corriente constante de 30-60 mA (según resolución deseada y tamaño del gel).

Como marcadores de peso molecular se emplearon:

- 1 Kpb DNA ladder (Productos BioLógicos), cuyo patrón de bandas es: 10.000, 9.000, 8.000, 7.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.000, 2.000 y 1.000 pb.
- 400 pb DNA ladder (Productos BioLógicos), cuyo patrón de bandas es: 3.560, 3.215/3.233, 2.838, 2.430, 2.040, 1.632, 1.193, 841 y 402 pb.
- 50 pb DNA ladder (Productos BioLógicos), cuyo patrón de bandas es: 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 y 50 pb.

3.10. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos sintéticos utilizados se describen en la Tabla III. En todos los casos se confeccionaron teniendo en cuenta la complementariedad de bases con las secuencias génicas de interés y la introducción de sitios de restricción en los extremos de dichas secuencias compatibles con cada vector, según el caso.

Tabla 3.III. Oligonucleótidos sintéticos utilizados en esta tesis. Se resaltan en *negrita* los sitios de restricción y *subrayados* los codones de inicio y de finalización de la traducción, según corresponda.

Nombre	Secuencia (5'→3')
Tb1ipT-Fw-BamHI	GGGGATCCATGAATGGAATGCGGGCGTA
Tb1ipT-Rv-EcoRI	GGGAATTCTTATTCAAGTTCGCAAAGGA
Tb1ipL-Fw-BamHI	GGGGATCCATGCGCGCTGCCAGACTGT
Tb1ipL-Rv-XhoI	GGCTCGAGTTAATAACTTATGGGGTAGAAGA
Tb1ipT-Fw-KpnI	GGGGTACCATGAATGGAATGCGGGCGTA
Tb1ipL-Fw-KpnI	GGGGTACCATGCGCGCTGCCAGACTGT

3.11. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

La banda de interés fue escindida del gel de agarosa y purificada con el kit comercial “*Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*” (GE Healthcare), según las instrucciones del fabricante.

3.12. Clonado en pCR®-Blunt II-TOPO® vector (Invitrogen)

Los productos amplificados por PCR con la polimerasa *Pfx50* se purificaron a partir del gel de agarosa. Se eluyeron en 30 µl de agua y se tomaron 5 µl para incubar con solución salina y 0,5 µl de vector pCR®-Blunt II-TOPO®. La reacción de ligación se incubó a temperatura ambiente durante media hora.

Se utilizaron 1 y 2,5 µl de la mezcla de ligación para transformar células competentes de *E. coli* DH5α por electroporación o por método químico (TSS), respectivamente. Se plaquearon en cajas de Petri con LB-agar kanamicina 50 µg/ml.

3.13. Clonado en vector pBluescript II KS (Stratagene)

Se utilizó la siguiente mezcla de reacción:

Inserto	14,5 µl
Vector	0,2 µl
Buffer Tango (Fermentas)	2 µl
T4 DNA ligasa (Fermentas) (1 U/ml)	2 µl
ATP (2mM)	1 µl
SmaI (Fermentas) (10 U/ml)	0,3 µl

Se dejó la mezcla de ligación incubando ON y al día siguiente se procedió a transformar células competentes de *E. coli* según se describe en el apartado 3.22, 3.23. Se dejaron creciendo ON las células transformadas y posteriormente se seleccionaron los clones positivos según se describe en el apartado siguiente.

3.14. Selección de clones transformantes de *E. coli*

Se basó en la resistencia que confiere el plásmido incorporado al antibiótico presente en el medio de cultivo donde se incubaron las bacterias transformadas. Sólo los clones efectivamente transformados con el plásmido correspondiente crecerán en presencia del antibiótico: kanamicina en el caso de pCR®-Blunt II-TOPO® (con y sin inserto), y ampicilina en el caso de pBluescript II KS (con y sin inserto).

Los clones que crecieron en estas condiciones se repicaron estriando una nueva placa con el mismo antibiótico y al día siguiente se chequeó la presencia de inserto mediante PCR de colonias y digestión con enzimas de restricción del ADN plasmídico purificado.

3.15. Secuenciación y análisis de secuencias

Los insertos o fragmentos de ADN clonados exitosamente fueron secuenciados a partir de preparaciones de ADN plasmídicas, enviadas al servicio “*DNA Sequencing Facility*” de la Universidad de Maine, Estados Unidos. Posteriormente dichas secuencias se compararon con aquellas registradas en las bases de datos *Trytryp* y *GeneDB*, en búsqueda de eventuales mutaciones de la secuencia original producidas durante la amplificación por PCR. Para ello se utilizó el programa *MegAlign* de Lasergene.

3.16. Preparación de ADN plasmídico

Siguiendo el método *boiling* (Sambrock y col., 1989), se realizó a partir de un cultivo crecido durante toda la noche (a 37°C y agitación de 250 rpm) en 3 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente, de uno o más clones seleccionados. Dichos cultivos saturados se cosecharon por centrifugación (5 minutos a 6.500 rpm) y el pellet celular obtenido se resuspendió en 100 µl de buffer de lisis alcalina, se mezcló por agitación vigorosa, se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, se dejó un minuto en hervor y luego un minuto en hielo. Luego de centrifugar durante 10 minutos a

14.000 rpm, el sobrenadante que contiene al ADN plasmídico fue separado del pellet. Se verificaron las preparaciones por electroforesis en geles de agarosa.

Las preparaciones que requerían mayor pureza se realizaron con el kit comercial “WIZARD® PLUS SV Minipreps DNA purification system” (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En estos casos se partió de 5 ml de cultivo.

3.17. Cuantificación de ADN

La concentración del ADN plasmídico purificado se determinará midiendo la absorbancia a 260 nm de acuerdo a la relación 1 OD = 50 µg/ml.

3.18. Digestión con enzimas de restricción

Las condiciones de digestión empleadas fueron las recomendadas por los proveedores de las enzimas de restricción. Se usó aproximadamente 1 U de enzima por µg de ADN. En los casos en que se digirió con una sola enzima de restricción se utilizó el buffer comercial recomendado. En los casos en donde se necesitó digerir con dos enzimas se buscó un buffer compatible para ambas. Las reacciones se incubaron en estufa a 37°C, generalmente durante una hora.

Cuando las digestiones fueron para posteriores subclonados se utilizó la mayor cantidad de ADN posible (dependiendo de su concentración) en un volumen final de 20 µl. Para chequear la presencia de insertos en un vector determinado sólo se usaron 5 µl y se completó con agua destilada hasta volumen final.

Los productos de las digestiones se chequearon mediante electroforesis en geles de agarosa.

3.19. Ligación inserto-vector

Para ligar un fragmento de ADN digerido con enzimas de restricción a un plásmido, se purificó el fragmento a partir de un gel de agarosa y se mezcló en una relación 3 a 1 (o 6 a 1) con el plásmido digerido con las mismas enzimas de restricción. El ADN de la mezcla se precipitó y se resuspendió en un volumen final de 10 µl, con buffer de ligación, 5 U de ADN ligasa del fago T4 y agua destilada. Se incubó toda la noche a temperatura ambiente.

3.20. Subclonado en vector p426 GPD

Se utilizaron 2,5 y 10 µl de la mezcla de ligación para transformar células competentes de *E. coli* DH5α por electroporación o por método químico (TSS), respectivamente. Se plaquearon en cajas de petri con LB-agar ampicilina 100 µg/ml.

Los clones transformantes positivos se seleccionaron según lo descrito en el apartado 3.14.

3.21. Preparación de bacterias y levaduras electrocompetentes

3.21.1. Preparación de bacterias electrocompetentes

Se llevó a cabo mediante el siguiente protocolo, en condiciones de esterilidad: un inóculo de la cepa deseada se incubó a 37°C durante la noche. Luego, se lo diluyó 100 veces en LB y se incubó a 37°C hasta una DO_{600nm} de 0,6. A continuación, las bacterias se concentraron mediante centrifugación a 6.500 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con agua destilada fría. Se volvieron a centrifugar, se descartó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en la mitad de volumen inicial de glicerol 10% a 4°C y se centrifugó nuevamente. Las bacterias finalmente se resuspendieron a razón de 0,5 ml de glicerol 10% por cada 100 ml de cultivo inicial, se fraccionaron en alícuotas de 40 µl y se congelaron a -80°C hasta su uso.

3.21.2. Preparación de levaduras electrocompetentes

Se llevó a cabo de acuerdo al siguiente protocolo, en condiciones de esterilidad: se tomó una colonia de la cepa de *S. cerevisiae* deseada y se utilizó para inocular 10 ml de medio YPD. Se lo incubó a 30°C con agitación durante toda la noche. A la mañana siguiente se centrifugó a 6.500 rpm por 5 minutos y se lavó el pellet dos veces con el mismo volumen de agua destilada fría y una vez con glicerol 10%. Luego se resuspendió en 1 ml de glicerol 10% y se transfirió a un tubo eppendorf de 1,5 ml. El lavado con glicerol 10% se repitió dos veces. Por último se resuspendieron las levaduras en glicerol 10% en una proporción de 1 ml por cada 60 µl de pellet (todos los pasos se llevaron a cabo manteniendo las soluciones y las suspensiones celulares en hielo). Se fraccionó en alícuotas de 50 µl por tubo y se congelaron a -80°C hasta su uso.

3.22. Transformación por electroporación

Esta técnica se empleó tanto en *E. coli* como en *S. cerevisiae*. Células competentes previamente preparadas (40 y 50 μ l, respectivamente) se mezclaron en frío con 1 μ l de ADN plasmídico o 2,5 μ l de mezcla de reacción de ligación, en una cubeta de electroporación de 0,2 cm de paso (BioRad) enfriada previamente, y se sometieron a un pulso eléctrico de 2,2 kV y 2,5 kV, respectivamente. Las células bacterianas se recuperaron en 1 ml de LB-glucosa 0,01% a 37°C y las levaduras en 1 ml de YPD a 30°C, tras ser trasvasadas a tubos de cultivo, durante una hora en ambos casos. Por último, se plaquearon en LB (o LB suplementado con acetato y succinato 0,5 mM, según el caso) con antibiótico(s) e YNBD sin uracilo, respectivamente, y se incubaron durante toda la noche.

3.23. Transformación por método químico (TSS)

Alternativamente, las células de *E. coli* fueron transformadas induciendo el estado de competencia a través de mecanismos químicos, siguiendo el siguiente protocolo. Cultivos en medio LB de la cepa deseada crecidos durante toda la noche fueron diluidos con medio fresco a la mañana siguiente a DO_{600nm} de aproximadamente 0,1 (volumen final de 2 ml) e incubados a 37°C hasta alcanzar DO_{600nm} de 0,4-0,5. En este punto fueron cosechados centrifugando 5 minutos a 6.500 rpm y el pellet celular se resuspendió en 100 μ l de solución TSS-DMSO 5% en un tubo eppendorf junto con 2 μ l de ADN plasmídico o 10 μ l de mezcla de reacción de ligación. La suspensión resultante se incubó durante 30 minutos en hielo, se sometió a estrés por calor pasándola a 42°C por 90 segundos y se volvió a poner en hielo. Por último, se recuperó en 1 ml de LB a 37°C durante una hora y se plaqueó en el medio y antibiótico que correspondiere.

3.24. Reversión de fenotipo mutante de crecimiento deficiente en *S. cerevisiae*

El ensayo se basó en el fenotipo de crecimiento de colonias cultivadas en placas de Petri. Se crecieron las cepas de interés en 1 ml de medio mínimo YNBD (con y sin uracilo, según corresponda) durante toda la noche; al día siguiente se midieron las respectivas DO_{600nm} y se diluyó con agua destilada estéril normalizando todos los cultivos a DO_{600nm} de 1,5. Posteriormente se realizaron cuatro diluciones seriadas al medio, en tubos eppendorf, para cada una de las cepas.

Finalmente, se sembraron 5 µl de cada dilución (*spots*) en una placa con el medio de cultivo a evaluar, disponiendo cada serie de 5 *spots* en una fila para una cepa determinada. Lo mismo se repitió para cada cepa en las filas subsiguientes.

Se evaluaron los medios ricos YPG, YPS, YPE, YPE suplementado con ácido octanoico o ácido lipoico 50 µM; y el medio mínimo YNB DGly. Las placas se incubaron a 30°C durante 5 o más días, según el caso.

3.26. Obtención de extractos proteicos totales de *E. coli*

A partir de cultivos de las distintas cepas de interés crecidos ON en LB (o LB suplementado, según el caso) se realizaron diluciones 1:100 a primera hora del día y se crecieron hasta alcanzar $DO_{600} = 0,6$ aproximadamente. En ese momento se agregó a cada cultivo el inductor IPTG (concentración final 5 mM) y se incubó durante tres horas más. Finalmente, se cosecharon los cultivos centrifugando a 6.000 rpm durante 5-10 minutos a 4°C y se resuspendieron los pellets en cracking buffer. Los extractos se cuantificaron por estimación visual de las cantidades relativas sembradas en cada pocillo de los geles de poliacrilamida.

3.27. Obtención de extractos proteicos mitocondriales de *S. cerevisiae*

Se crecieron cultivos ON de las distintas cepas de interés (en distintos medios, según el experimento) y a la mañana siguiente (los cultivos en YNB DGly se incubaron unas horas más por su crecimiento más lento) se cosecharon y se resuspendieron los pellets en 300-500 µl de buffer de extracción de proteínas suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas (Roche). Las células se sometieron a ruptura mecánica vortexeando las muestras junto con bolitas de vidrio (Sigma) y sonicando posteriormente según el siguiente esquema: 30 segundos de vórtex más 20 segundos de incubación en hielo, repitiendo de tres a cinco veces; luego sonicar durante 7 minutos utilizando pulsos (30-40%) de 30 segundos, con intervalos equivalentes y repetir la sonicación. A continuación se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 3.000x g (4°C), se recolectaron los sobrenadantes y se volvieron a centrifugar, esta vez a 20.000x g durante 5 minutos más y a la misma temperatura. Se recuperaron los pellets – enriquecidos en la fracción mitocondrial–, se lavaron con buffer MOPS 10 mM pH 7,2, EDTA 1 mM y sacarosa 250 mM, se resuspendieron en el mismo buffer y se centrifugaron a 20.000x g durante 5 minutos (4°C). Se volvieron a recuperar y lavar los

pellets y finalmente se resuspendieron en cracking buffer. Los extractos se cuantificaron por estimación visual de las cantidades relativas sembradas en cada pocillo de los geles de poliacrilamida.

3.28. Obtención de extractos proteicos totales de *T. cruzi*

Cultivos de parásitos en fase exponencial de crecimiento ($2-5 \times 10^7$ células/ml) se cosecharon por centrifugación durante 5 minutos a 5.500 rpm y 4°C, se lavaron con PBS y se resuspendieron en buffer de lisis (NaCl 150 mM, Tritón X-100 1%, Tris-HCl pH 50 mM y coctel de inhibidores de proteasa (Roche)). Luego se los vortexeó tres veces durante un minuto, con intervalos de cinco minutos incubando en hielo. Finalmente, se centrifugaron a 15.000x g durante 20 minutos a 4°C y se recuperaron los sobrenadantes. Estos últimos fueron cuantificados por el método de Lowry.

3.29. Dosaje de proteínas

La concentración de proteínas fue determinada mediante el método descrito por Lowry y col. (1951) utilizando como patrón una solución de albúmina sérica bovina de concentración conocida.

3.30. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Las electroforesis de proteínas se llevaron a cabo según el método descrito por Laemmli (1970), utilizando el sistema *Mini-Protean II Cell* (BioRad). Se utilizó un sistema discontinuo que consiste en un gel de concentración (poliacrilamida 4,5% en Tris-HCl 0,126 M, pH 6,8; SDS 0,26% p/v) seguido por un gel de separación (poliacrilamida 10% en Tris-HCl 0,36 M, pH 8,8; SDS 0,26% p/v). En todos los casos, la relación acrilamida:bisacrilamida fue 30:1.

Las muestras proteicas se hirvieron en buffer Laemmli durante 10 minutos, se centrifugaron a 14.000 rpm durante un minuto para descartar restos sólidos (pellet) que obstruyan la corrida electroforética y se sembraron entre 20 y 30 µl de muestra por calle. La carga proteica de siembra se normalizó según la concentración dosada o estimada previamente en cada muestra.

La electroforesis se desarrolló en buffer de electroforesis de proteínas SDS-PAGE 1X, a amperaje constante y 20/30 mA por gel.

Los marcadores de peso molecular utilizados fueron los siguientes:

NEB prestained broad range: 175, 80, 58, 46, 30, 25, 25, 17, 7 kDa (NEB).

PageRuler Plus Prestained Protein Ladder: 250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15, 10 kDa (Thermo Scientific).

Las proteínas separadas mediante electroforesis se visualizaron tiñéndolas con azul Coomassie R-250 0,2% p/v en solución fijadora (metanol 50% v/v y ácido acético 10% v/v). Los geles se destiñeron sumergiéndolos en una solución de metanol 40% v/v y ácido acético 10% v/v, o por ebullición en agua destilada durante 10 minutos.

3.31. Inmunodetección de proteínas fijadas en membrana (*western blot*)

El análisis por *western blot* se llevó a cabo por métodos estándar (Towbin y col., 1979). Los componentes de la mezcla proteica fueron separados mediante SDS-PAGE y los geles procesados como se describe a continuación.

3.32.1. Electrotransferencia de proteínas

Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham Biosciences, GE Healthcare) utilizando la solución de transferencia y el sistema de transferencia húmeda de BioRad a 10 mA, 4°C, durante 4 horas. La eficiencia del proceso se puso de manifiesto sumergiendo la membrana en una solución de Rojo Ponceau S (Sigma) 0,5% p/v, en ácido acético glacial 1% v/v.

3.32.2. Inmunodetección de Proteínas Inmovilizadas en Membrana

Una vez terminado el proceso de transferencia, las membranas fueron bloqueadas sumergiéndolas durante 1 hora en solución de bloqueo: T-PBS (PBS/Tween-20 0,1% v/v) con leche en polvo desnatada al 5% (p/v). Seguidamente, la membrana se lavó una vez, durante 10 minutos y dos veces más, durante 5 minutos, con T-PBS. Las proteínas transferidas a membrana se incubaron con el anticuerpo primario anti-lipoamida diluido 1:1000 (Abcam) en T-PBS, durante toda la noche a 4°C. Después de lavar la membrana como en el paso anterior, se incubó con el anticuerpo monoclonal antiinmunoglobulina G humana, conjugado con peroxidasa de rabanito (Pierce) diluido 1:5000 en T-PBS durante 2 horas. Se repitió el paso de lavado y se reveló la membrana

empleando el *kit* de quimioluminiscencia ECL® Plus™ (Amersham Biosciences, GE Healthcare).

3.33. Ensayos de inhibición de crecimiento en cultivos de *T. cruzi*

3.33.1. Ensayos de inhibición con 8-bromo-octanoato (BrO)

Cultivos de *T. cruzi* de la cepa CL Brener en el estadio epimastigote fueron crecidos a 28°C en medio LIT en presencia y ausencia de 8-bromo-octanoato, análogo estructural del ácido lipoico. La droga se utilizó en diferentes concentraciones (2, 1 y 0,5 mM) y fue solubilizada en DMSO. La concentración del solvente en el cultivo en ningún caso fue mayor al 1% (v/v); no se observaron efectos adversos al respecto. Como control de crecimiento se utilizó un cultivo en medio LIT con DMSO.

A partir de un cultivo en fase exponencial ($2-5 \times 10^7$ parásitos/ml) se calculó su concentración por conteo de células en cámara de Neubauer y se diluyó de manera de obtener cultivos de concentración inicial 1×10^6 parásitos/ml, con y sin tratamiento, para comenzar el experimento. La evolución de los diferentes cultivos se siguió calculando su concentración por conteo de células en cámara de Neubauer cada 48 horas, durante 7 días.

La concentración necesaria de droga para la inhibición del 50% del crecimiento fue anotada como EC₅₀.

Ensayos similares se realizaron utilizando la cepa Dm28c.

3.33.2. Ensayos de inhibición con metil-8-bromo-octanoato (MBrO)

Se ensayó el efecto del derivado metil éster del BrO. Para ello se utilizó el mismo protocolo, ya descrito en el apartado anterior. Los ensayos se realizaron tanto en la cepa CL Brener como en DM28c, siempre en el estadio epimastigote.

3.34. Síntesis del derivado metil éster del 8-bromo-octanoato

Se disolvieron 0,22 miligramos de ácido octanoico (Sigma) contenidos en un tubo de vidrio en 1,5 ml de metanol-HCl 5% y se los incubó durante dos horas a 85°C en un termobloque. Posteriormente se agregó 1 ml de hexano a la muestra, se vortexeó para mezclar y se centrifugó durante tres minutos a 500 rpm en centrífuga Rolco, quedando así formadas dos fases, una acuosa (abajo) y otra orgánica (arriba). Se tomó la

fase orgánica conteniendo el derivado metil éster del ácido 8-bromo-octanoico (MBrO) disuelto en hexano y se trasvasó a un tubo de vidrio limpio donde se realizó un secado con nitrógeno. El sólido remanente (MBrO) se disolvió en etanol absoluto formándose así una solución madre 2 mM a partir de la cual se prepararon soluciones 75, 50 y 25 μ M.

3.35. Ensayo de transporte de [1- 14 C]octanoato en cultivos de *T. cruzi*

Se utilizó un protocolo basado en el trabajo de Voorheis (1980): a tubos con 500 μ l de cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial de crecimiento y concentración inicial 2×10^8 parásitos/ml en medio LIT, se les agregó 500 μ l de medio LIT sin suero fetal bobino, que además contenía: albúmina sérica humana libre de ácidos grasos (5 μ M) como *carrier* de octanoato (o del control, palmitato), 1 μ l (396.290 cpm) de [1- 14 C]octanoato (New England Nuclear), y octanoato frío (60 μ M). Los mismos fueron incubados a 30°C en un baño termostatzado. Dicha incubación fue interrumpida a diferentes tiempos (15 segundos, 1, 5, 10 y 30 minutos), adicionando 10 ml de buffer fosfato salino (PBS) a 0°C y poniendo los cultivos en hielo. Inmediatamente se cosecharon y resuspendieron en 500 μ l de PBS, los cuales se utilizaron para medir radioactividad en contador de centelleo líquido. A partir de las cuentas por minuto (cpm) incorporadas en cada cultivo se calcularon los μ moles de octanoato incorporados. El mismo tratamiento se aplicó utilizando palmitato (frío y marcado con 14 C: New England Nuclear; 548.977 cpm/ μ l de solución stock) como control en lugar de octanoato.

3.36. Ensayo de transporte de [1- 14 C]octanoato en competencia con ácido lipoico en cultivos de *T. cruzi*

El mismo experimento descrito en el apartado anterior se llevó a cabo adicionando a cada cultivo ácido lipoico 150 μ M (o ácido palmítico frío 150 μ M como control) y se evaluó si su presencia afectaba las tasas de incorporación observadas previamente.

3.37. Marcación isotópica de proteínas en cultivos de *T. cruzi*

Se suplementaron cultivos de 4 ml de *T. cruzi* epimastigotes en medio LIT con 10 μ l (4×10^6 cpm) de [1- 14 C]octanoato (New England Nuclear), precursor inmediato

en la síntesis de AL. Dichos cultivos, de concentración inicial 1×10^7 células/ml, se incubaron durante 48 horas a 28°C, y posteriormente fueron cosechados, lavados y resuspendidos en buffer Laemmli 1X. Las muestras así obtenidas se procesaron adecuadamente y se corrieron en SDS-PAGEs. Las proteínas fueron transferidas según lo descrito en la sección 3.32.1 y las membranas fueron expuestas durante siete días en placas para *phosphorimager* STORM 840 (GE HealthCare) y finalmente fueron reveladas en el correspondiente equipo.

3.38. Fraccionamiento subcelular con digitonina

Se ensayó el fraccionamiento diferencial con detergentes descrito inicialmente por Ramsby y Makowski (1999) modificando los tiempos de incubación y los inhibidores de proteasas y fosfatasa empleados y los detergentes utilizados, ya que sólo se trabajó con digitonina a diferentes concentraciones. El pellet obtenido al cosechar cada cultivo se lavó con solución RBF (NaCl 145 mM, KCl 11 mM, Tris-HCl 75 mM pH 7,4). Luego el mismo se resuspendió en 200 µl de RBF con coctel de inhibidores de proteasas (CIP; Roche) y se adicionaron 200 µl de digitonina 0,03 mg/ml. Se incubó la mezcla durante 5 minutos a 37°C y se agregaron 45 µl de sacarosa 0,3 M. Finalmente se centrifugó durante 5 minutos a 13.000 rpm a 4°C y se recolectó el sobrenadante (fracción 1). El mismo proceso se repitió con el pellet así obtenido, centrifugando a 10.000 rpm y variando la concentración de digitonina sucesivamente (0,3; 1,5 y 10 mg/ml), obteniéndose las fracciones 2, 3 y 4. En la última etapa se resuspendió el pellet en 400 µl de RBF, se agregaron 45 µl de sacarosa 0,3 M, se vortexeó y se incubó durante 5 minutos a 37°C. Se centrifugó 5 minutos a 10.000 rpm (4°C) y se recolectó el último sobrenadante (fracción 5). El pellet se descartó. Se obtuvieron así las fracciones 4 y 5 enriquecidas en proteínas de citoesqueleto y mitocondriales.

3.39. Determinación de actividad oxoácido deshidrogenasa en *T. cruzi*

Se realizó por medición del aumento de absorbancia a 340 nm debido a la producción enzimática de NADH. Para ello, una mezcla de reacción formada por Tris-HCl 150 mM pH 7,5, MgCl₂ 1 mM, cisteína 3mM, coenzima A 0,2 mM, NAD⁺ 4 mM y un extracto proteico (de cultivos crecidos en cada una de las diferentes condiciones) conteniendo aproximadamente 150 µg de proteínas totales.

Para cada medición, en una primera instancia, se agregó a dicha mezcla de reacción Tritón 0,1%, se mezcló por inversión y se dejó reposar durante cinco minutos para permitir que la mezcla se asiente, evitando así interferencias por la dispersión de luz que producen las partículas en suspensión. La reacción enzimática se inició posteriormente por el agregado de los sustratos específicos para cada deshidrogenasa (piruvato, α -cetoglutarato o isovalerato) y se siguió durante cinco minutos más.

4. Capítulo I

El metabolismo de lipoilación de proteínas de *Trypanosoma cruzi* es un potencial blanco quimioterapéutico

4.1. Introducción

El tratamiento de las infecciones por tripanosomas depende de un pequeño número de drogas que tienen limitada eficacia y pueden causar severos efectos secundarios (Wilkinson y Kelly, 2009). Estas circunstancias, sumadas a la falta de perspectivas inmediatas sobre el desarrollo de vacunas, hacen que el surgimiento de nuevos tratamientos sea prioritario. Es por ello que un mayor entendimiento de la biología de los parásitos permitiría la identificación de nuevos blancos para el diseño de estrategias quimioterapéuticas (Wilkinson y Kelly, 2009).

Como se explicó en la Introducción General, el ácido lipoico es una molécula esencial para la viabilidad de la mayoría de los organismos procariotas y eucariotas de metabolismo aeróbico. No sólo por su participación como cofactor de complejos multienzimáticos que intervienen en la respiración celular y el metabolismo central (Spalding y Prigge, 2010; Cronan, 2016) sino también por su acción antioxidante y su consecuente papel como regulador redox (Singh y Jialal, 2008; Shay y col., 2009). Es por ello que decidimos evaluar la relevancia del metabolismo de lipoilación de proteínas en *Trypanosoma cruzi*, pues representa un potencial blanco quimioterapéutico de efecto altamente pleiotrópico.

Existen antecedentes en la utilización de análogos de AL para el estudio de sus efectos sobre el crecimiento de microorganismos. Podemos citar a los ácidos diselenolipoico, 8(6)-seleno-6(8)-tiooctanoico y 8-bromo-octanoico (BrO), cuyos efectos han sido estudiados en organismos tan diversos como *Escherichia coli* (Spalding y Prigge, 2010) y los protozoos parásitos *Toxoplasma gondii* (Crawford y col., 2006) y *Plasmodium falciparum* (Allary y col., 2007; Storm y Müller, 2012; Falcard y col., 2013). El más estudiado ha sido el BrO (Figura 4.1B) que, como análogo estructural de AL afecta los mecanismos de lipoilación. Diversas evidencias plantean que al ser incorporado sobre las apoenzimas blanco, estas se vuelven no funcionales ya

que BrO no permite la inserción posterior del primer átomo de azufre en el carbono 8 del potencial cofactor, pues éste se encuentra unido al bromo (Crawford y col., 2006; Allary y col., 2007) y además podría afectar el transporte de AL al interior celular y su ulterior tráfico a las mitocondrias en eucariotas (Crawford y col., 2006; Allary y col., 2007).

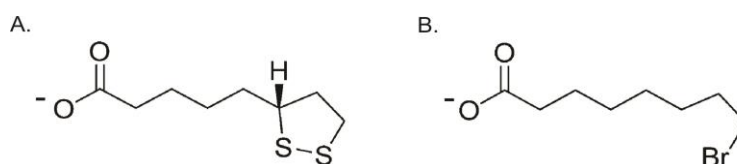


Figura 4.1. Estructura del lipoato (forma aniónica de AL) (A) y el análogo 8-bromo-octanoato (B). (Adaptado de Allary y col., 2007).

En base a estos antecedentes y a la disponibilidad comercial de la droga, se decidió ensayar el efecto del BrO sobre cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* de las cepas CL Brener y Dm28c.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto de análogos de AL sobre el crecimiento de cultivos de *T. cruzi* epimastigotes.
- Describir el patrón de lipoilación de proteínas de *T. cruzi* en su estadio epimastigote.
- Determinar el efecto de análogos de AL sobre el patrón de lipoilación en *T. cruzi*.
- Determinar el efecto de los análogos de AL sobre las actividades enzimáticas oxoácido deshidrogenasas en *T. cruzi*.
- Validar el metabolismo de lipoilación de proteínas de *T. cruzi* como potencial blanco quimioterapéutico.

4.3. Resultados y Discusión

4.3.1. Efecto de análogos de ácido lipoico sobre la viabilidad celular

4.3.1.1. El 8-bromo-octanoato tiene un efecto letal en cultivos de *T. cruzi*

Para evaluar el efecto de análogos de AL sobre el crecimiento de *T. cruzi*, se utilizaron cultivos del parásito de las cepas CL Brener y Dm28c en su estadio epimastigote. Se ensayaron cantidades crecientes de la droga BrO y se observó el comportamiento de los cultivos durante siete días. El BrO *tuvo un efecto lítico* sobre ambas cepas (Figuras 4.2 y 4.3). No obstante, las concentraciones de droga utilizadas fueron muy elevadas como para considerarlas de relevancia quimioterapéutica. El EC_{50} (concentración que reduce un 50% la tasa de crecimiento) calculado a las 72 horas de tratamiento fue de $0,591 \pm 0,190$ mM para CL Brener y $0,829 \pm 0,033$ mM para Dm28c.

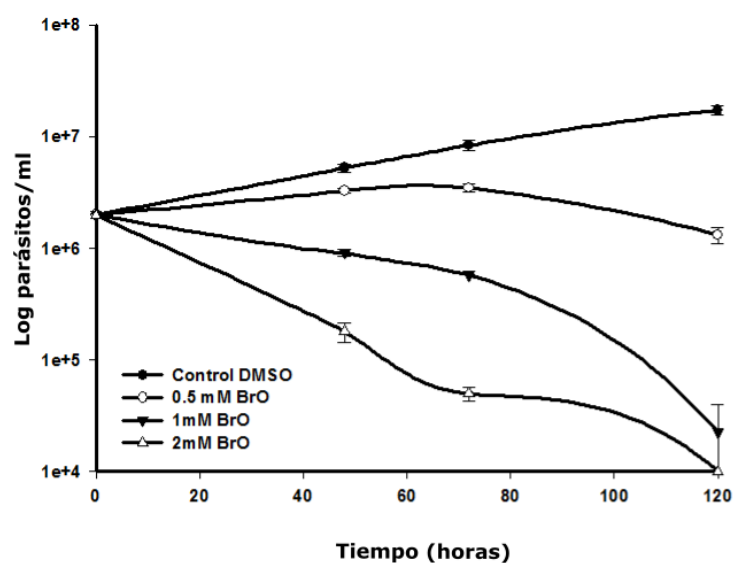


Figura 4.2. Ensayo de inhibición de crecimiento con BrO sobre cultivos de *T. cruzi* CL Brener epimastigotes. Distintos cultivos fueron tratados con concentraciones de la droga (0; 0,5; 1 y 2 mM) y se observó su comportamiento durante siete días. En la figura se muestran sólo los primeros cinco días, para una mejor visualización de los efectos diferenciales de cada concentración de la droga. La densidad celular de parásitos se obtuvo mediante conteo en cámara de Neubauer.

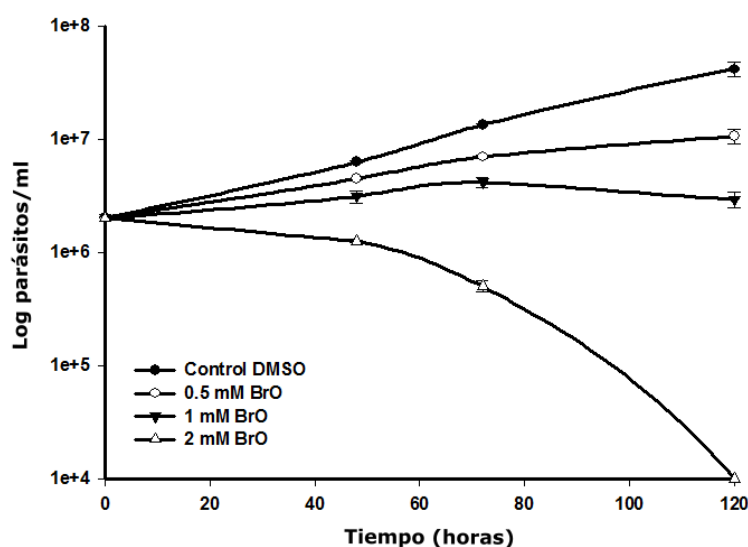


Figura 4.3. Ensayo de inhibición de crecimiento con BrO sobre cultivos de *T. cruzi* Dm28c epimastigotes. Distintos cultivos fueron tratados con concentraciones de la droga (0; 0,5; 1 y 2 mM) y se observó su comportamiento durante siete días. En la figura se muestran sólo los primeros cinco días, para una mejor visualización de los efectos diferenciales de cada concentración de la droga. La densidad celular de parásitos se obtuvo mediante conteo en cámara de Neubauer.

Organismos capaces de internalizar AL exógeno y por ende sus análogos, mostraron ser más sensibles al BrO. Concentraciones del orden 100 μM tuvieron efecto inhibitorio en cultivos de *Plasmodium falciparum* (Allary y col., 2007) e incluso de 10 μM para *Toxoplasma gondii* (Crawford y col., 2006). No se ha estudiado si *T. cruzi* es capaz de rescatar AL del medio ambiente. El único antecedente reportado proviene de los estudios de Stephens y colaboradores (2007) sobre la síntesis de ácidos grasos mitocondrial en *T. brucei*. En uno de sus experimentos, observaron que cepas knockout para ACP disminuían drásticamente la cantidad de AL celular y la lipoilación de proteínas, así como el crecimiento de los parásitos. Más aún, al suplementar estas mutantes con AL o con ácido octanoico no lograron revertir la deficiencia en el crecimiento de los cultivos. Esto sugiere que los tripanosomas no poseerían vías de salvataje pese a codificar en sus genomas enzimas con cierta homología a lipoato proteína ligasas. Nuestros resultados junto con los reportados en la bibliografía sugieren que las altas concentraciones de BrO requeridas para inhibir el crecimiento de las formas epimastigotas de *T. cruzi* podrían deberse a que la droga no es internalizada apropiadamente.

Para poner a prueba esta hipótesis se realizó un ensayo de transporte de [^{14}C]-octanoato, dada la no disponibilidad comercial de AL y BrO radioactivos.

4.3.1.2. *T. cruzi* no transporta específicamente octanoato

Cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa CL Brener se suplementaron con [$1-^{14}\text{C}$]-octanoato y se midió su incorporación a las células en función del tiempo. Como puede observarse en la Figura 4.4 la incorporación de octanoato no fue significativa. La escasa radioactividad asociada al pellet celular puede deberse a la unión inespecífica del sustrato a la superficie de las células, incluso luego del agregado de albúmina sérica, o a la internalización inespecífica mediada por otros transportadores. Esto sugiere la inexistencia de transporte específico para el octanoato. Se utilizó [$1-^{14}\text{C}$]-palmitato como control positivo en un ensayo paralelo, cuya cinética de incorporación es conocida en tripanosomátidos (Voorheis, 1980), además de haberse sugerido la existencia de transportadores específicos para ácidos grasos de cadena media y larga (Uttaro, 2014). Este sustrato fue incorporado activamente al pellet celular de *T. cruzi* (Figura 4.4).

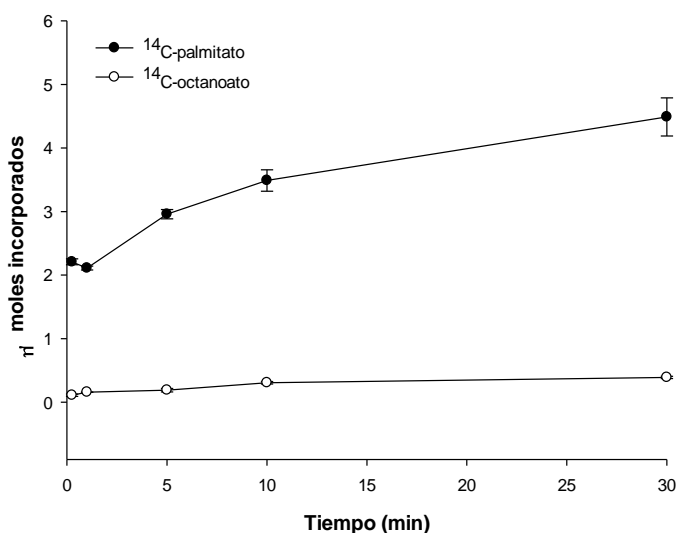


Figura 4.4. Curvas de incorporación de [$1-^{14}\text{C}$]-octanoato y [$1-^{14}\text{C}$]-palmitato en cultivos de *T. cruzi* epimastigotes (CL Brener).

La incorporación de octanoato (30 μM) fue competida parcialmente por el agregado de palmitato (150 μM) no radioactivo, pero no por la presencia de lipoato (150 μM) (Figura 4.5), indicando que la escasa internalización de octanoato puede ser

mediada parcialmente por el sistema de transporte de palmitato, y que AL no es internalizado por dicho sistema.

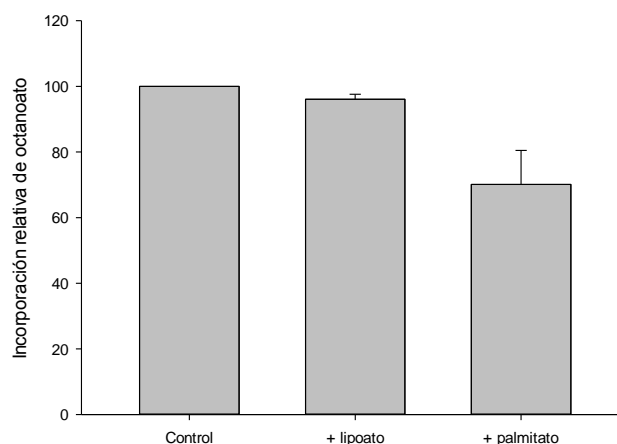


Figura 4.5. Incorporación de $[1-^{14}\text{C}]$ -octanoato en presencia de lipoato o palmitato.

Poco es lo que se conoce sobre los mecanismos de internalización de AL en organismos unicelulares como bacterias y protozoos. En *E. coli* y *En. faecalis* estaría relacionado con transportadores de tiamina (Griffith y col., 1983) y en *P. falciparum* con transportadores de pantotenato (Storm y Müller, 2012). En tejidos animales AL es capaz de ser incorporado a las células a través de transportadores de vitaminas sodio-dependientes (Prasad y col., 1998) y transportadores de ácidos monocarboxílicos protón-dependientes (Takaishi y col., 2007). La ausencia de estas clases de transportadores en tripanosomátidos podría explicar la ausencia de salvataje de AL, la baja incorporación de octanoato y la toxicidad de BrO solo a concentraciones muy elevadas, sin utilidad quimioterapéutica. Al respecto, el único trabajo encontrado donde se hace referencia explícita a estos transportadores describe una baja eficiencia del sistema de incorporación de tiamina y moléculas análogas (Stoffel y col., 2006).

En los mismos experimentos de transporte de $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato se exploró la posible existencia de proteínas marcadas radioactivamente, mediante western blots y autorradiografía directa de las membranas, sin evidenciar marca alguna. Dado que AL y octanoato libres suelen ser utilizados por ligasas para acilar las subunidades E2 de α -OADHs y la proteína H del CCG, se puede concluir que, al menos en las condiciones descritas, no se aprecia actividad ligasa en *T. cruzi*, lo cual es coherente con la ausencia de salvataje.

4.3.1.3. El éster metílico de 8-bromo-octanoato (MBrO) tiene un efecto inhibitorio diez veces mayor que BrO

En un intento de aumentar la incorporación de análogos de AL, se sintetizó el derivado metil éster del BrO (MBrO, Figura 4.6). Nuestro razonamiento fue que de esta manera se aumentaría el ingreso por difusión libre, independiente de transportadores, a través de las membranas celulares. El MBrO se utilizó como sustrato en un nuevo ensayo de inhibición de crecimiento en cultivos de *T. cruzi* CL Brener y Dm28c epimastigotes (Figuras 4.7 y 4.8).

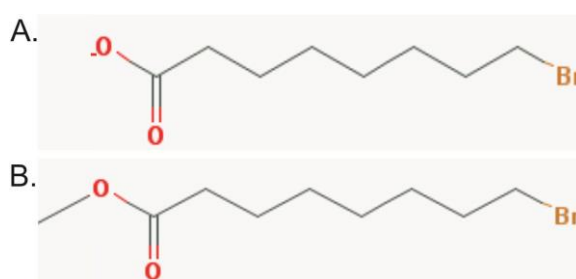


Figura 4.6. Comparación de las estructuras del BrO (A) y su derivado metil éster MBrO (B). Nótese el grupo metilo en la posición 1 de MBrO que vuelve al compuesto menos polar y más permeable que BrO.

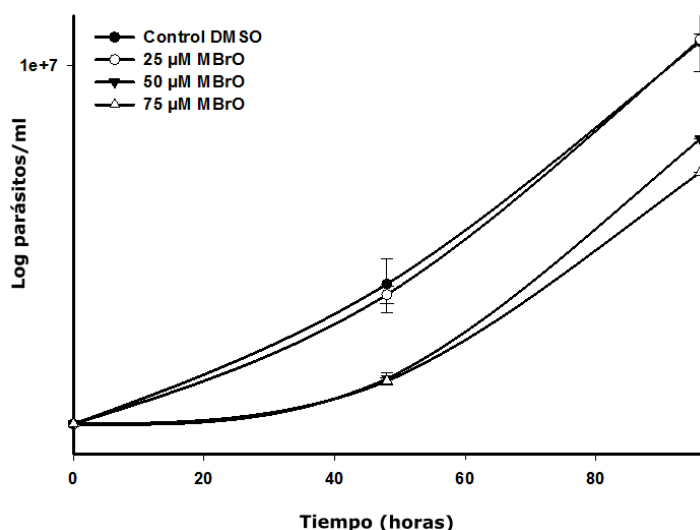


Figura 4.7. Efecto de MBrO sobre la viabilidad celular de cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* Cl Brener. Distintos cultivos fueron tratados con concentraciones de la droga (25, 50 y 75 μ M) y se observó su comportamiento durante siete días. En la figura se muestran sólo los primeros cuatro días, para una mejor visualización de los efectos diferenciales de cada concentración de la droga.

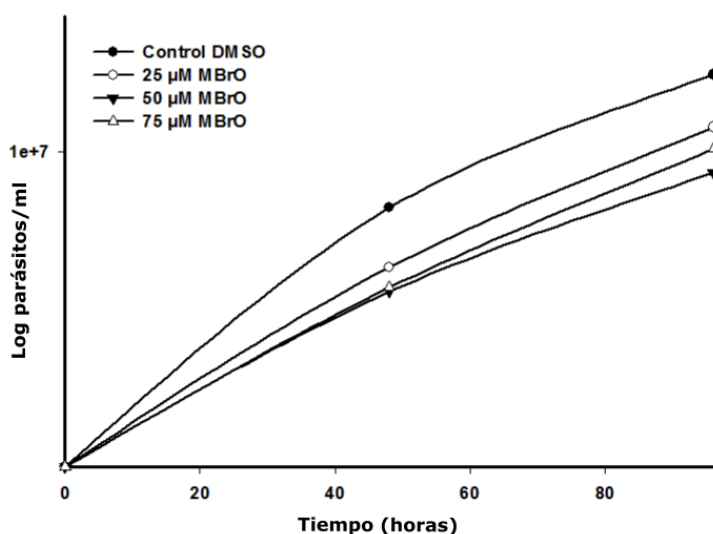


Figura 4.8. Efecto de MBrO sobre la viabilidad celular de cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* Dm28c. Distintos cultivos fueron tratados con concentraciones de la droga (25, 50 y 75 µM) y se observó su comportamiento durante siete días. En la figura se muestran sólo los primeros cuatro días, para una mejor visualización de los efectos diferenciales de cada concentración de la droga.

En concordancia con nuestras expectativas de mayor permeabilidad y, por ende, mayor efecto deletéreo, el EC_{50} del MBrO fue más de un orden de magnitud inferior al de BrO en ambas cepas ($66,18 \pm 10,40$ µM y $62,17 \pm 7,46$ µM) y aproximadamente un 50% inferior al obtenido con *P. falciparum* y BrO (100 µM, según Allary y col., 2007).

A partir de los resultados expuestos se puede concluir que:

- Los análogos estructurales de AL (BrO y MBrO) inhiben el crecimiento de los parásitos.
- AL, octanoato y el análogo BrO son pobremente incorporados al interior celular, evidencia adicional de ausencia de salvataje de AL en estos organismos.
- La mayor toxicidad de MBrO se debe a su mayor permeabilidad a través de la membrana celular de los parásitos.

4.3.2. Efecto de análogos de ácido lipoico sobre el patrón de lipoilación

4.3.2.1. BrO y MBrO interfieren con la lipoilación de proteínas

Comprobado el efecto deletéreo de BrO y MBrO sobre la viabilidad de los parásitos, decidimos evidenciar si estos análogos estructurales actuaban afectando las vías de lipoilación de proteínas.

Con esta finalidad, se realizaron western blots con anticuerpos comerciales anti-lipoamida sobre extractos totales de cultivos tratados con BrO 1 mM o MBrO 100 μ M y DMSO como control (Figura 4.9A), todos cosechados a las 72 horas de tratamiento.

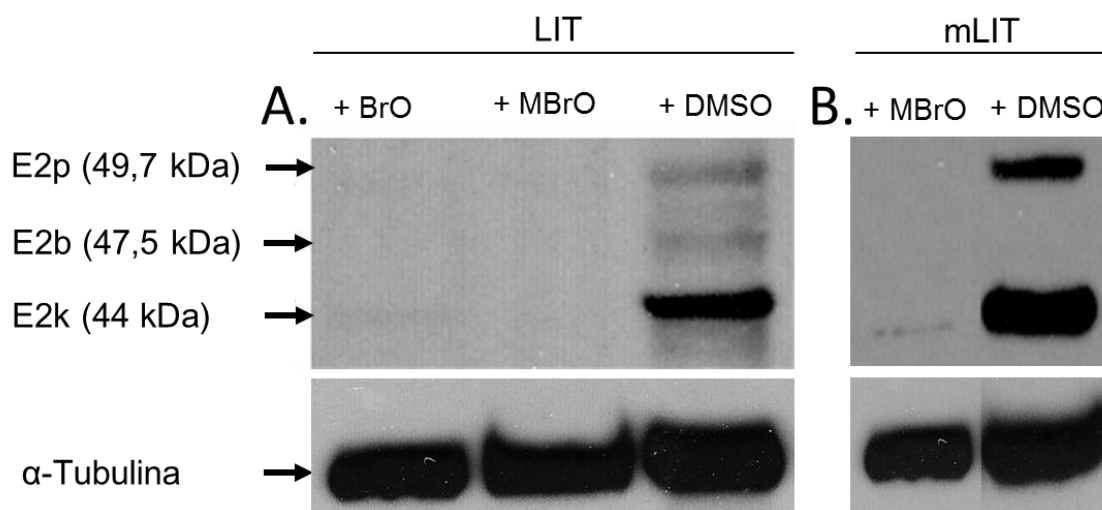


Figura 4.9. Patrón de lipoilación observado en cultivos de *T. cruzi* epimastigotes mediante western blots anti-lipoamida sobre extractos totales de proteína. **A.** Cultivos en medio LIT (Glc 4 g/l): tratados con BrO 1 mM (calle 1), MBrO 100 μ M (calle 2), y DMSO como control (calle 3). **B.** Cultivos en medio LIT modificado (mLIT; Glc 0,4 g/l): tratados con MBrO 100 μ M (calle 1) y DMSO como control (calle 2). TcE2p, subunidad E2 de PDH; TcE2b, subunidad E2 de BCDH; TcE2k, subunidad E2 de KGDH. En todos los casos se sembró la misma cantidad de proteínas por calle (20 μ g).

En los cultivos control se obtuvo un patrón de tres bandas que, por sus pesos moleculares, corresponderían a las subunidades E2 de los tres complejos α -OADH reportados en la bibliografía (Spalding y Prigge, 2010): TcE2p (subunidad E2 de PDH), de 49,7 kDa; TcE2b (BCDH), 47,5 kDa, y TcE2k (KGDH), 44 kDa. Notablemente, el tratamiento a concentraciones subletales de ambos análogos, BrO y MBrO, produjo una completa inhibición de la lipoilación de proteínas. Esto demuestra que estarían interfiriendo en la transferencia de grupos acilo desde sus respectivos dadores

(putativamente: octanoil-ACP, octanoil-CoA, lipoil-H) por las correspondientes acil/amido transferasas o la transferencia de grupos sulfidrilos desde S-adenosil-metionina por la lipoato sintasa (suponiendo la inexistencia de lipoil/octanoil ligasas, debido a la carencia de salvataje).

4.3.2.2. Las condiciones de crecimiento afectan el patrón de lipoilación

Otro punto importante a destacar del análisis del westernblot de la Figura 4.9 es la baja reactividad que mostró el anticuerpo contra las bandas correspondientes a las subunidades TcE2p y TcE2b, en comparación con la TcE2k. Podemos especular que esto se debe a una expresión diferencial de las distintas subunidades (y por consiguiente de sus respectivas deshidrogenasas) o a una lipoilación selectiva vinculada a la expresión diferencial de acil transferasas específicas para cada subunidad. Cualquiera sea el caso sería esperable encontrar condiciones que estimulen la lipoilación de TcE2b y especialmente TcE2p, dado el rol central de PDH en el metabolismo mitocondrial y celular.

Estas deshidrogenasas pueden verse estimuladas según el estadio dentro del ciclo de vida del parásito, expresándose diferencialmente entre las formas epimastigote, tripomastigote y amastigote, reflejando cambios metabólicos, así como la disponibilidad de fuentes de carbono. También podrían expresarse diferencialmente a lo largo del ciclo celular de una forma en particular, dependiendo de la fuente de carbono disponible. Epimastigotes de *T. cruzi* utilizan preferencialmente glucosa como fuente de carbono y energía, pero son capaces de metabolizar prolina si no disponen de carbohidratos, situación que encontrarían en su paso por el intestino del insecto vector (Bringaud y col., 2012). El metabolismo de glucosa es realizado vía glucólisis, que transcurre mayoritariamente en glicosomas. El piruvato producido por la piruvato kinasa citosólica es posteriormente metabolizado en mitocondria por la PDH. El acetil-CoA resultante es utilizado para la producción adicional de energía a nivel de sustrato mediante la combinación de las actividades acetato:succinato CoA-transferasa/succinil-CoA sintetasa. En ausencia de glucosa, la prolina es metabolizada a α -cetoglutarato en mitocondria, el cual es convertido a succinil-CoA por la KGDH. El subsecuente metabolismo de succinil-CoA a fumarato permite la obtención de energía a nivel de sustrato (Bringaud y col., 2012). Esto evidencia el importante rol de ambas deshidrogenasas en el metabolismo energético y del carbono en tripanosomas.

Los epimastigotes de cultivo son habitualmente crecidos en medios con alto contenido de glucosa (medio LIT, 4 g/l). Nos preguntamos entonces, si podríamos estimular la lipoilación de otras deshidrogenasas disminuyendo la disponibilidad de glucosa en un orden de magnitud (0,4 g/l). A tal fin, se cultivaron parásitos en condiciones de baja glucosa (medio LIT modificado o mLIT), de manera de realizar posteriormente un nuevo western blot. Como primer paso se estudió el comportamiento de los cultivos en estas condiciones. Como se observa en la Figura 4.10, las bajas concentraciones de glucosa no impidieron el crecimiento de los parásitos aunque sí afectaron la cinética del proceso; en mLIT, alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento más rápido que en LIT, alrededor del cuarto día de cultivo.

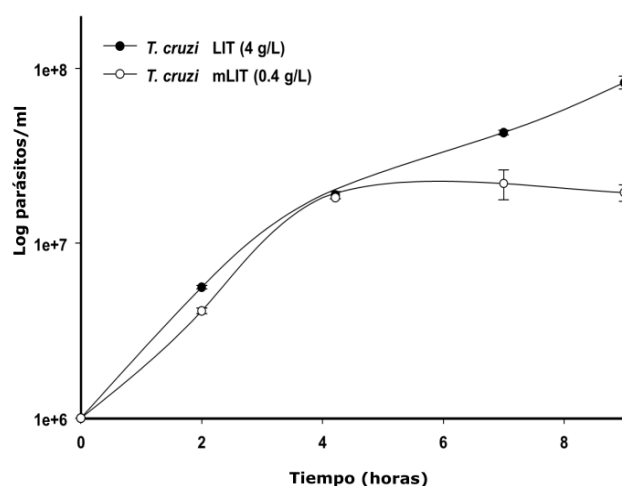


Figura 4.10. Curvas de crecimiento de cultivos de *T. cruzi* epimastigotes (Dm28c) en condiciones de alta (LIT) y baja (mLIT) glucosa.

Se realizaron nuevos cultivos, incluyendo el tratamiento con MBrO 100 μ M en mLIT hasta las 72 horas, tiempo al que se cosecharon, se obtuvieron extractos proteicos totales y se utilizaron para nuevos western blots contra proteínas lipoiladas. Como se observa en la Figura 4.9B (apartado 4.3.2.1), la señal correspondiente a la subunidad E2 de PDH aumenta notoriamente en condiciones de baja glucosa. No menos importante, una vez más el tratamiento con MBrO disminuye sensiblemente las señales de todas las proteínas lipoiladas.

Dada la relevancia de los resultados obtenidos se procedió a realizar fraccionamientos de nuevos extractos de manera de obtener fracciones enriquecidas en

las proteínas de interés y así lograr una mayor sensibilidad. Mediante el uso de digitonina, las fracciones 4 y 5 representan extractos enriquecidos en proteínas mitocondriales (ver Materiales y Métodos). El tratamiento se realizó a partir de cultivos crecidos en las tres condiciones: LIT, mLIT y mLIT + MBrO 100 μ M. Las fracciones así obtenidas fueron sujetas a SDS-PAGE y western blot (Figura 4.11). Nuevamente, la señal correspondiente a TcE2p fue mucho más intensa en las fracciones obtenidas a partir de cultivos crecidos en baja glucosa. Por otro lado, el agregado de MBrO a cultivos crecidos en estas mismas condiciones disminuyó notablemente todas las señales de proteínas lipoiladas. Los resultados reafirman la idea de que las condiciones de crecimiento afectan el patrón de lipoilación y que MBrO interfiere con dicha lipoilación.

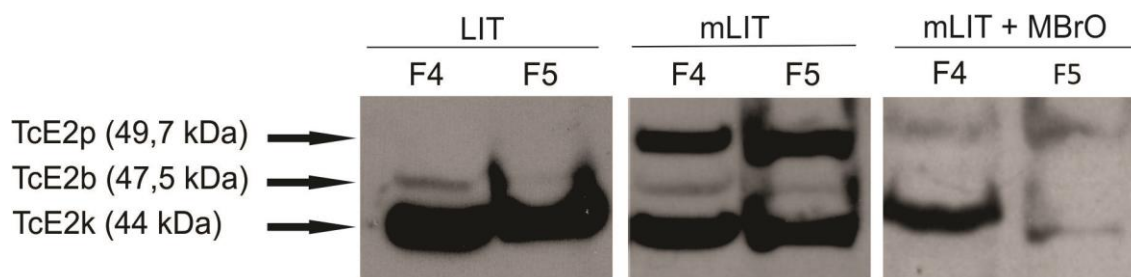


Figura 4.11. Patrón de lipoilación de las fracciones 4 y 5 de extractos totales de *T. cruzi* tratados con digitonina, obtenidos a partir de tres condiciones de cultivo: LIT, mLIT y mLIT + MBrO 100 μ M. TcE2p, subunidad E2 de PDH; TcE2b, subunidad E2 de BCDH; TcE2k, subunidad de KGDH. En todos los casos se sembró la misma cantidad de proteínas por calle (20 μ g).

4.3.2.2. Las actividades enzimáticas α -OADH son afectadas por MBrO y las condiciones de crecimiento

Finalmente, se midieron las actividades enzimáticas de las tres deshidrogenasas mitocondriales a partir de extractos totales de cultivos crecidos en las tres condiciones utilizadas con anterioridad. Esto permitió correlacionarlas con las señales del western blot, aportando a la identificación de cada una de ellas. En la Tabla 4.I se aprecia que la PDH posee una actividad específica cinco veces superior en cultivos crecidos a baja concentración de glucosa, lo que correlaciona con la señal notablemente incrementada de la banda de 49 kDa observada en los western blots (Figuras 4.9 y 4.11). Esto confirma que dicha banda corresponde a TcE2p. La banda con movilidad aparente de 47,5 kDa pertenecería a la TcE2b, cuya enzima (BCDH) posee muy baja actividad

específica en todas las condiciones ensayadas. La KGDH parece ser insensible a la concentración de glucosa, tanto en su actividad específica como en la intensidad relativa de la banda correspondiente a TcE2k. El MBrO inhibe totalmente las tres actividades enzimáticas. La actividad malato deshidrogenasa no se vió afectada en forma significativa por las condiciones de crecimiento o tratamiento con análogos de lipoato (dato no mostrado), indicando que el efecto descrito es solo sobre enzimas lipoiladas.

Tabla 4.I. Actividad α -OADH de extractos totales de cultivos de *T. cruzi* Dm28c crecidos en diferentes condiciones. Las actividades enzimáticas específicas están expresadas en U = μ moles/min/mg. El experimento fue realizado por duplicado y los resultados expuestos son los promedios de las mediciones.

ND, no detectable.

	mLIT	LIT	mLIT + MBrO
PDH	3	0,6	ND
KGDH	0,6	0,55	ND
BCDH	0,21	ND	ND

Del análisis de este segundo grupo de experimentos se concluye que:

- El patrón de lipoilación de *T. cruzi* es modificado por la disponibilidad de glucosa en el medio de cultivo.
- Los análogos BrO y MBrO inhiben el metabolismo de lipoilación de proteínas.
- Los análogos BrO y MBrO inhiben la actividad de los complejos multienzimáticos que requieren AL como cofactor.

Tomados en su conjunto, los experimentos descritos en este capítulo nos permiten validar químicamente el metabolismo de lipoilación de proteínas de *T. cruzi* como blanco quimioterapéutico.

5. Capítulo II

Identificación y caracterización funcional de una octanoil-ACP:proteína *N*-octanoiltransferasa de *Trypanosoma brucei*

5.1. Introducción

En el Capítulo I de esta tesis se describen los experimentos realizados que demuestran la esencialidad del metabolismo de lipoilación para la viabilidad del parásito *Trypanosoma cruzi*. Los resultados expuestos validan dicho metabolismo como blanco quimioterapéutico, que además poseería la ventaja de tener un efecto ampliamente pleiotrópico. Estos resultados son alentadores y plantean la necesidad de profundizar nuestro conocimiento sobre los mecanismos involucrados en el metabolismo de lipoilación del parásito, los cuales deben ser lo suficientemente divergentes en términos evolutivos de aquellos presentes en el ser humano para poder diseñar fármacos inocuos para nuestra salud (Krauth-Siegel y Schöneck, 1995).

Como se explicó en la Introducción General, existen en la naturaleza dos estrategias de lipoilación de proteínas: la síntesis *de novo* de ácido lipoico (AL) y el salvataje de AL libre (Spalding y Prigge, 2010; Cronan, 2014, 2016). Por lo demostrado también en el Capítulo I, *T. cruzi* carece de una vía de salvataje. Para comprender con mayor detalle los mecanismos involucrados en la vía de síntesis *de novo* de AL decidimos confirmar la identificación bioinformática reportada en la bibliografía de las enzimas intervinientes y caracterizarlas funcionalmente.

En este punto es necesario aclarar que se resolvió trabajar con las secuencias de *T. brucei* dado que el genoma de *T. cruzi* fue realizado sobre la cepa CL Brener, un híbrido de poliploidía incierta y especie que se caracteriza por poseer múltiples alelos. Otra ventaja de *T. brucei* es la existencia de herramientas genéticas que permiten la obtención de líneas mutantes e incluso interferentes (Ngô y col., 1998). El proteoma conservado (El-Sayed y col., 2005) y los varios aspectos del metabolismo energético compartidos por ambos organismos (Bringaud y col., 2006) sustentan aún más esta aproximación.

En particular, nos centramos en dos de las tres enzimas identificadas, aquellas con homología a octanoiltransferasas y a lipoato proteína ligasas. Estas presentan la

mayor variabilidad mecánica y funcional entre distintos organismos, tanto procariotas como eucariotas, ya que la enzima restante, un ortólogo de lipoato sintasa, pertenece a una familia altamente conservada (Lu y col., 2014). La caracterización de una enzima octanoiltransferasa putativa se desarrollará en el presente capítulo y la de una enzima con homología a lipoato proteína ligasas, en el capítulo siguiente.

Si bien las octanoiltransferasas poseen una vía canónica de transferencia de grupos octanoilos desde la proteína ACP a las subunidades lipoilables, a través de un intermediario acil-enzima (Zhao y col., 2005), se han encontrado en la naturaleza muchas variantes de los mecanismos de síntesis *de novo* de AL en los que intervienen.

Entre las enzimas caracterizadas bioquímicamente y funcionalmente podemos citar a LipB de *Escherichia coli*, (Jordan y Cronan, 2003; Zhao y col., 2005) y LipB de *Kluyveromyces lactis* (Chen, 1997), capaces de octanoilar tanto la proteína H del CCG como subunidades E2 de los complejos α -OADH; LipM de *Bacillus subtilis* (Christensen y Cronan, 2010; Christensen y col., 2011) y Lip2 de *Saccharomyces cerevisiae* (Marvin y col., 2001), específicas para la proteína H; LipB en *Plasmodium falciparum* (Wrenger y Müller, 2004), específica para la subunidad E2 del complejo PDH; y las isoenzimas LIP2 (Wada y col., 2001; Ewald y col., 2014a), LIP2p y LIP2p2 (Ewald y col., 2014b) en *Arabidopsis thaliana*, las cuales actúan sobre E2k en mitocondria y E2p en cloroplasto, respectivamente. Cabe destacar que en este último caso tanto LIP2p como LIP2p2 actúan de forma redundante sobre el mismo sustrato.

En este capítulo se describe en primera instancia el análisis *in silico* de las secuencias reportadas para los tripanosomátidos homólogos a octanoiltransferasas, lipoato proteína ligasas y lipoato sintasas (Spalding y Prigge, 2010). Posteriormente se desarrolla un análisis bioinformático pormenorizado de las secuencias correspondientes específicamente a *T. brucei* y, finalmente, se detallan y discuten los experimentos realizados durante la caracterización de TbLipT, una octanoiltransferasa putativa de esta especie.

5.2. Objetivos específicos

- Confirmar mediante análisis bioinformático la existencia de secuencias codificantes de enzimas putativas para la síntesis *de novo* de AL en tripanosomátidos.
- Analizar bioinformáticamente y predecir la estructura y función de las distintas proteínas encontradas en *T. brucei*.
- Caracterizar funcionalmente la enzima TbLipT, ortóloga de octanoiltransferasas.

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Identificación y análisis bioinformático de ortólogos de enzimas involucradas en la síntesis *de novo* de ácido lipoico

Para confirmar la existencia en tripanosomátidos de probables ortólogos de enzimas vinculadas al metabolismo de lipoilación de proteínas reportada en la bibliografía (Spalding y Prigge, 2010) se realizaron búsquedas de tipo BLASTP (Altschul y col., 1997) en los proyectos genoma (<http://www.tritrypdb.org/tritrypdb/>) de *T. cruzi* (cepa CL Brener), *T. brucei* (cepa TREU927) y *L. major* (cepa Friedlin) utilizando como semillas las secuencias proteicas de las enzimas involucradas en las vías de síntesis *de novo* y/o salvataje de AL de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Saccharomyces cerevisiae*. Se encontraron posibles ortólogos de octanoil-ACP:proteína *N*-octanoiltransferasas (octanoiltransferasas), lipoato sintetas y enzimas con homología a lipoato proteína ligasas (Tabla 5.I). En cada organismo se encontró una sola secuencia para cada una de las enzimas, con la excepción de *T. cruzi*, donde siempre se encontraron dos, debido a la duplicación de su genoma. Por otro lado, se realizó la búsqueda de genes ortólogos a la amidotransferasa (LipL) de *B. subtilis*, obteniéndose resultados negativos.

Posteriormente, estas secuencias se utilizaron a su vez como semillas en BLASTP globales que permitieron la construcción de árboles filogenéticos con el software MEGA7 (Kumar y col., 2016), mediante los métodos de máxima probabilidad, *neighbor-joining* y evolución mínima. Se alinearon secuencias de distintos organismos pertenecientes a taxones representativos como metazoos, plantas, hongos, protozoos y bacterias. Las putativas octanoiltransferasas de los tripanosomátidos agruparon en un

clado compartido con plantas (Figura 5.1), las lipoato sintasas con hongos (Figura 5.2), mientras que las enzimas con homología a lipoato proteína ligasas lo hicieron con metazoos, incluyendo *Homo sapiens* (Figura 5.3).

Tabla 5.I. Secuencias de proteínas putativas involucradas en la síntesis y/o salvataje de AL, encontradas en los distintos tripanosomátidos mediante BLASTP. Se muestran los resultados obtenidos utilizando como semilla secuencias de *E. coli*.

Organismo	Secuencia	GenBank	Puntaje	Valor E
<i>Lipoato sintasas</i>				
<i>T. brucei</i>	Tb10.61.1530	EAN78865.1	228.6/635	6.2e-63
<i>T. cruzi</i>	Tc00.1047053511291.30	EAN90088.1	223.0/619	3.1e-61
<i>T. cruzi</i>	Tc00.1047053506211.10	EAN97594.1	220.1/611	2.2e-60
<i>L. major</i>	LmjF.19.0350	CAJ07120.1	219.8/610	2.7e-60
<i>Octanoiltransferasas</i>				
<i>T. cruzi</i>	Tc00.1047053508851.40	EAN92615.1	63.5/166	3.3e-13
<i>T. cruzi</i>	Tc00.1047053511587.120	EAN91274.1	59.6/155	1.4e-11
<i>T. brucei</i>	Tb11.01.1160	EAN79891.1	58.6/152	9.8e-11
<i>L. major</i>	LmjF.36.3080	CAJ09270.1	56.8/147	8.0e-10
<i>Lipoato proteína ligasas</i>				
<i>L. major</i>	LmjF.07.1060	CAJ07073.1	108.9/295	2.2e-26
<i>T. cruzi</i>	Tc00.1047053510857.50	EAN85875.1	104.0/281	7.9e-25
<i>T. cruzi</i>	Tc00.1047053509611.100	EAN92947.1	102.9/278	1.7e-24
<i>T. brucei</i>	Tb927.8.630	AAZ12834.1	91.7/246	2.2e-20

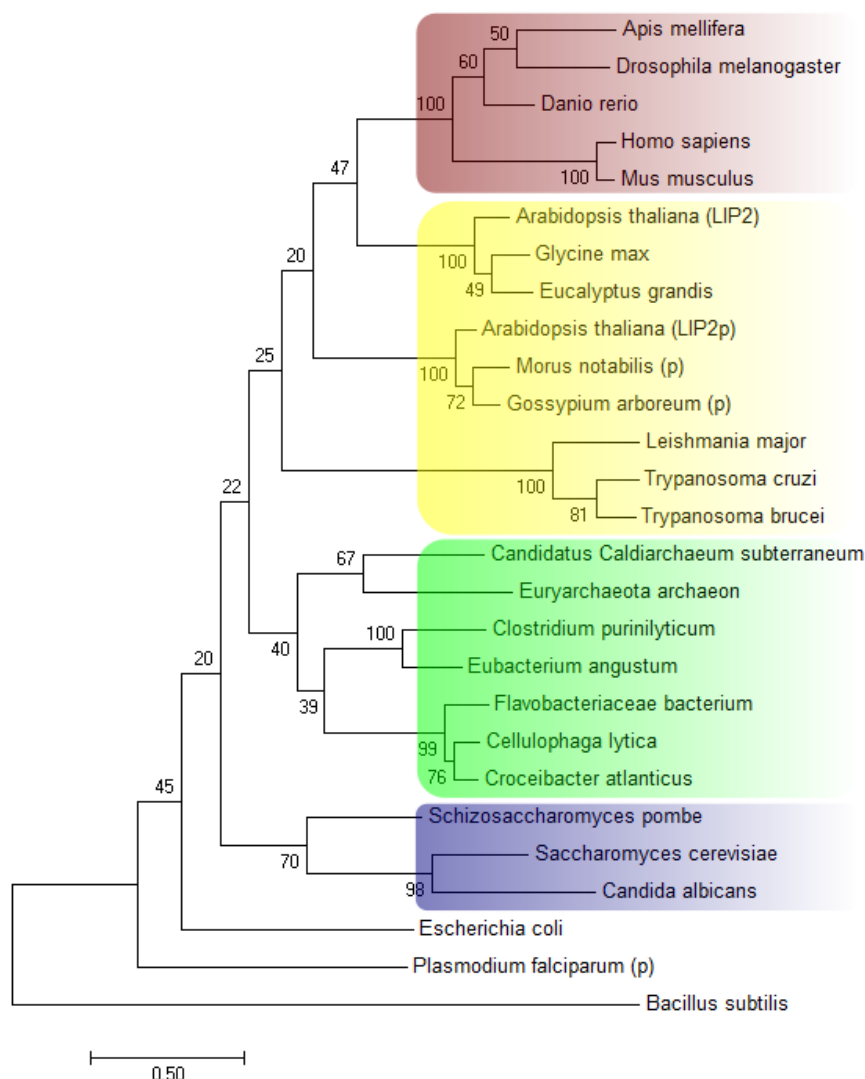


Figura 5.1. Árbol filogenético de octanoiltransferasas, realizado mediante el programa MEGA 7 según el método de Máxima Probabilidad (los resultados obtenidos mediante los métodos *Neighbor-Joining* y Evolución Mínima son similares). Los números de acceso de las secuencias aminoacídicas utilizadas para el análisis son los siguientes: *Apis mellifera* (NP_001229370.1); *Arabidopsis thaliana* (LIP2, Q9SXP7.1; LIP2p, Q948J9.1); *Plasmodium falciparum* (plastídica, CAD51137.2); *Candidatus Caldiarchaeum subterraneum* (BAJ48783.1); *Cellulophaga lytica* (ADY28509.1); *Clostridium purinilyticum* (WP_050356126.1); *Danio rerio* (NP_001035082.1); *Drosophila melanogaster* (NP_649472.1 CG9804); *Eubacterium angustum* (WP_071064298.1); *Euryarchaeota archaeon* (OGS49371.1); *Flavobacteriaceae bacterium* (KIJ62235.1); *Morus notabilis* (plastídica, EXB51235.1); *Schizosaccharomyces pombe* (NP_594748.1); *Bacillus subtilis* (P54511.2); *Glycine max* (XP_003555295.1); *Croceibacter atlanticus* (WP_013186870.1); *Saccharomyces cerevisiae* (NP_013340.1); *Leishmania major* (CAJ09270.1); *Candida albicans* (KGQ98711.1); *Trypanosoma cruzi* (EAN92615.1); *Escherichia coli* (AKF71110.1); *Gossypium arboreum* (plastídica, KHG05107.1); *Homo sapiens* (NP_001138341.1); *Mus musculus* (NP_080286.2); *Trypanosoma brucei* (EAN79891); *Eucalyptus grandis* (XP_018724442.1).

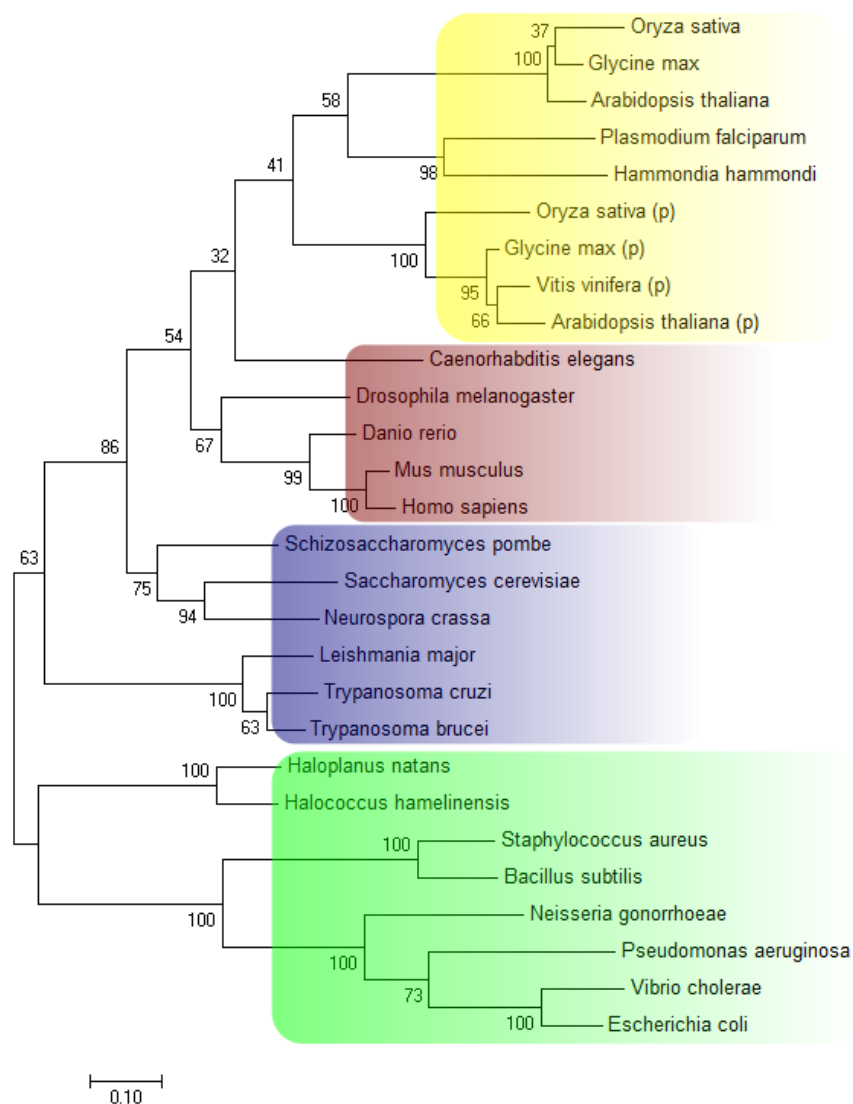


Figura 5.2. Árbol filogenético de lipoato sintasas, realizado mediante el programa MEGA 7 según el método de Máxima Probabilidad (los resultados obtenidos mediante los métodos *Neighbor-Joining* y Evolución Mínima son similares). Los números de acceso de las secuencias aminoacídicas utilizadas para el análisis son los siguientes: *Vitis vinifera* (p, XP_002270080.1); *Vibrio cholerae* (ABQ19826.1); *Trypanosoma cruzi* (EAN90088.1); *Trypanosoma brucei* (EAN78865.1); *Staphylococcus aureus* (CAG42570.1); *Schizosaccharomyces pombe* (NP_595577.1); *Saccharomyces cerevisiae* (CAA99409.1); *Pseudomonas aeruginosa* (AAG07383.1); *Leishmania major* (CAJ07120.1); *Plasmodium falciparum* (CAD52569.1); *Oryza sativa* (XP_015633364.1; p, XP_015638121.1); *Neurospora crassa* (XP_964726.1); *Neisseria gonorrhoeae* (AAW89507.1); *Mus musculus* (NP_077791.1); *Hammondia hammondi* (XP_008882011.1); *Haloplanus natans* (WP_049937612.1); *Halococcus hamelinensis* (WP_007691269.1); *Homo sapiens* (O43766.3); *Glycine max* (XP_003543350.1; p, XP_003555873.1); *Escherichia coli* (CTX27039.1); *Danio rerio* (NP_001103871.1); *Arabidopsis thaliana* (NP_179682.1; p, BAB91180.1); *Drosophila melanogaster* (NP_524183.2); *Caenorhabditis elegans* (NP_497722.3); *Bacillus subtilis* (AOA55994.1).

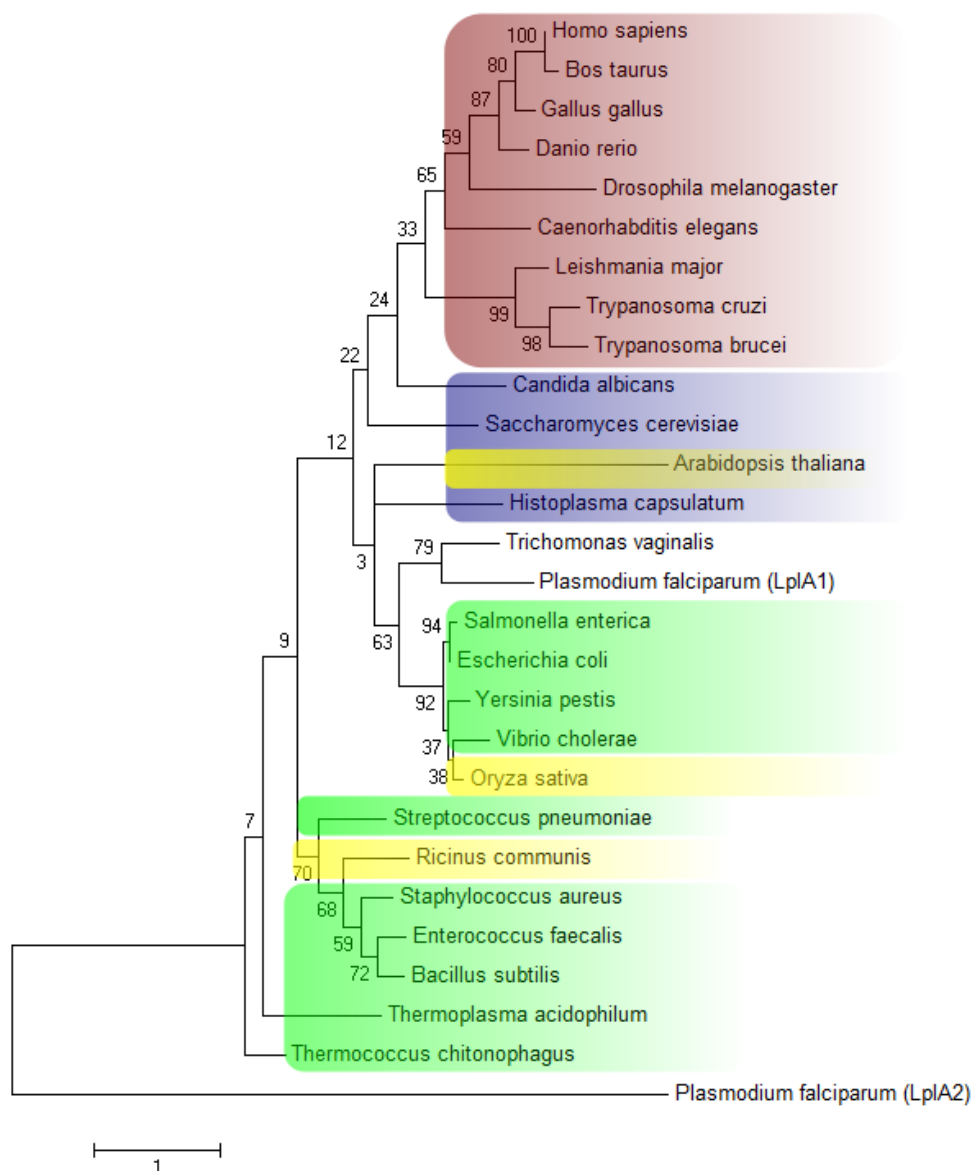


Figura 5.3. Árbol filogenético de enzimas con similitud a lipoato proteína ligasas, realizado mediante el programa MEGA 7 según el método de Máxima Probabilidad (los resultados obtenidos mediante los métodos *Neighbor-Joining* y Evolución Mínima son similares). Los números de acceso de las secuencias aminoacídicas utilizadas para el análisis son los siguientes: *Yersinia pestis* (CAL21041.1); *Vibrio cholerae* (ABQ20166.1); *Trypanosoma cruzi* (EAN85875.1); *Trypanosoma brucei* (AAZ12834.1); *Trichomonas vaginalis* (EAX90813.1); *Thermoplasma acidophilum* (WP_010900939.1); *Thermococcus chitonophagus* (CUX78482.1); *Streptococcus pneumoniae* (AAK99851.1); *Staphylococcus aureus* (CAG42736.1); *Salmonella enterica* (AAL23391.1); *Saccharomyces cerevisiae* (NP_012489.2); *Ricinus communis* (EEF26208.1); *Plasmodium falciparum* (LplA1, CAD52290.1; LplA2, CAD51918.1); *Oryza sativa* (EEC83485.1); *Leishmania major* (CAJ07073.1); *Homo sapiens* (NP_057013.1); *Histoplasma capsulatum* (EEH08859.1); *Gallus gallus* (NP_001264683.1); *Escherichia coli* (CUU96779.1); *Enterococcus faecalis* (AAO82441.1); *Danio rerio* (NP_001068570.1); *Drosophila melanogaster* (NP_001188958.1); *Candida albicans* (EEQ46720.1); *Caenorhabditis elegans* (NP_492468.2); *Bos taurus* (NP_777220.1); *Bacillus subtilis* (KIX82248.1); *Arabidopsis thaliana* (BAA95754.1).

5.3.2. Análisis bioinformático de secuencias codificantes de enzimas putativas involucradas en la síntesis *de novo* de ácido lipoico en *T. brucei*

Como primera aproximación se realizó un análisis *in silico* de los productos de los genes Tb11.01.1160 (actualmente Tb927.11.9390) (octanoiltransferasa putativa; de ahora en adelante *TbLipT*), Tb10.61.1530 (actualmente Tb927.10.15010) (lipoato sintasa putativa; *TbLipS*) y Tb927.8.630 (lipoato proteína ligasa putativa; *TbLipL*). *TbLipT* codifica para una proteína de 265 aminoácidos y 29.641 Da; *TbLipL* para una de 512 aminoácidos y 57.053 Da y *TbLipS* para una de 409 aminoácidos y 45.477 Da. Mediante la aplicación *online* MitoProt II (<https://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>; Claros, 1995) se predijo una localización mitocondrial en todos los casos. Finalmente, mediante el programa Swiss-Model del sitio EXPASY (<http://swissmodel.expasy.org/>) (Tabla 5.II) se predijo la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas codificadas por las distintas secuencias aminoacídicas de interés, y en base a dichas estructuras se predijo su función por comparación con enzimas caracterizadas bioquímicamente y cuyas estructuras se conocen por cristalografía de rayos X. El análisis dio como resultado una estructura proteica y función características de octanoiltransferasas para *TbLipT* (Figura 5.4A), por comparación con la octanoiltransferasa de *Mycobacterium tuberculosis* (Figura 5.4B), con la cual comparte un 30,2% de identidad. Un análisis análogo de *TbLipL* predijo una estructura y función características de lipoato proteína ligasas, por comparación con la ligasa de *Streptococcus pneumoniae*, cuyo grado de identidad es del 23,6% (Figura 5.4.C y D). El modelado de *TbLipS* indicó que sería una lipoato sintasa, por comparación con la lipoato sintasa de *Thermosynechococcus elongatus*, observándose el mayor grado de identidad (43,7%) de las tres secuencias analizadas (Figura 5.4. E y F).

Tabla 5.II. Estructura y función predicha para las secuencias aminoacídicas de *T. brucei* mediante el programa Swiss-Model del sitio EXPASY (<http://swissmodel.expasy.org/>).

Secuencia	Función	Modelo	% Identidad
TbLipT	octanoiltransferasa	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	30,2
TbLipL	lipoato proteína ligasa	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	23,6
TbLipS	lipoato sintasa	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	43,7

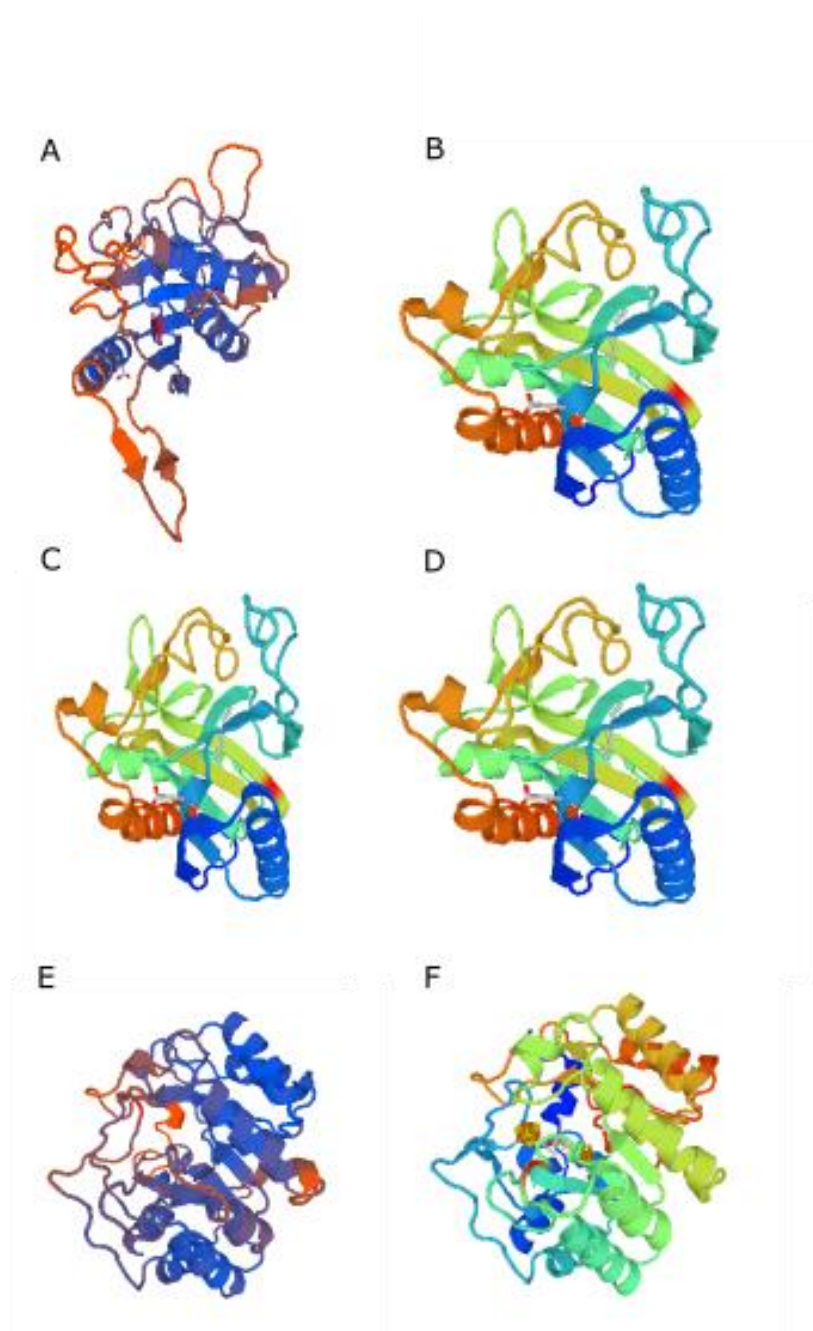


Figura 5.4. Estructura tridimensional predicha para las distintas enzimas putativas involucradas en la lipoilación de proteínas en *T. brucei*, por comparación con modelos de estructura deducida por cristalografía de rayos X. **A.** TbLipT. **B.** MtLipB, octanoiltransferasa de *M. tuberculosis*. **C.** TbLipL. **D.** SpTbLip3, lipoato proteína ligasa de *S. pneumoniae*. **E.** TbLipS. **F.** TeLipA, lipoato sintasa de *T. elongatus*.

En base a estos resultados se realizó un análisis comparativo entre las secuencias aminoacídicas de cada una de las enzimas putativas encontradas en *T. brucei* y sus homólogos identificadas en organismos representativos de distintos taxones. Además se

incluyó en la comparación las secuencias de enzimas putativas encontradas en *T. cruzi* dado que en principio sería posible extraer conclusiones comunes a ambos tripanosomátidos. Esta posibilidad se fundamenta en su cercanía filogenética y en las similitudes metabólicas (Bringaud y col., 2006). Más aún, la ausencia de una vía de salvataje de AL en *T. cruzi* –demostrada en el Capítulo I de esta tesis– pese a codificar una enzima con homología a lipoato proteína ligasas es congruente con los indicios de una situación análoga en *T. brucei*, según experimentos realizados por Stephens y colaboradores (2007), previamente descriptos en la Introducción General.

El análisis de TbLipS (Figura 5.5.) muestra un alto grado de conservación en las secuencias comparadas (resaltadas en rojo), características de las lipoato sintasas (Lu y col., 2014). Se destacan (recuadrados en amarillo) dos motivos conservados de cisteínas (Yasuno y Wada, 1998): **CXXXCXXC**, en las posiciones 125 a 136 (68 a 79 en *E. coli*), sobre el cual se forma el cluster canónico $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$, y **CXXXXCXXXXXC**, del cluster $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ auxiliar, en las posiciones 159 a 166 (94 a 101 en *E. coli*) (Jarrett, 2014). El porcentaje de identidad con respecto a las distintas secuencias oscila entre un 41 y 47% y es de 75,6% con respecto a *T. cruzi* (Tabla 5.III).

En el caso de TbLipL (Figura 5.6) y sus potenciales ortólogos, se observan distintos motivos conservados (recuadrados en amarillo) que, en el caso de las enzimas con actividad lipoato proteína ligasa, se encuentran en el bolsillo de unión a lipoil-AMP y son los encargados de interactuar con dicho sustrato (Schonauer y col., 2009). Cabe destacar que estos motivos también se encuentran en enzimas que, pese a la similitud de secuencia, no poseen la misma actividad, como ocurre con Lip3 en levaduras, una probable octanoil-CoA:proteína transferasa (Hermes y Cronan, 2013) o amidotransferasa (Cronan, 2016). TbLipL podría ser otro caso de conservación de similitud de secuencia pero no actividad enzimática. Es de esperarse que en estas enzimas dichos motivos conservados interactúen con otros sustratos, como podría ser octanoil-CoA en Lip3. Por otro lado, también se encuentra en todos los organismos comparados el residuo conservado de lisina (K169 en *T. brucei*; K134 en *E. coli*; K249 en *S. cerevisiae*) que en las ligasas interactúa mediante puentes hidrógeno con el oxígeno del grupo carbonilo de lipoil-AMP facilitando la transferencia del grupo lipoilo al residuo conservado de lisina de las apoproteínas (Schonauer y col., 2009). Dicho residuo mostró ser esencial para la actividad incluso en enzimas que no ligan AL, como

la mencionada Lip3 (Schonauer y col., 2009). TbLipL posee un porcentaje de identidad similar con las enzimas de todos los organismos comparados (alrededor del 19%) salvo con LplA de *E. coli*, con la que comparte llamativamente un 25,3% de identidad, y con el ortólogo de *T. cruzi* (48,8%) (Tabla 5.III).

Con respecto a TbLipT (Figura 5.7) el análisis muestra la presencia de varios motivos conservados (recuadrados en amarillo) y destaca el residuo catalítico de cisteína 195 (C169 en *E. coli*) encargado de formar el enlace tioéster con el residuo octanoilo a transferir, característico de las octanoiltransferasas (Zhao y col., 2005; Ma y col., 2006), constituyendo otro indicio de la posible funcionalidad de la enzima. También está presente el residuo invariante de lisina (K161 en *T. brucei*; K135 en *E. coli*) que colabora con C169 durante la catálisis y además es esencial para la función de todas las biotin/lipoil/octanoil transferasas (Ma y col., 2006). Por otro lado, se observa un porcentaje de identidad cercano al 27% con la mayoría de los organismos comparados, a excepción de *S. cerevisiae* y *B. subtilis* con quien comparte 23,1% y 12,3% de identidad, respectivamente (Tabla 5.IV). No es de extrañar que haya menor grado de identidad con la octanoiltransferasa de *B. subtilis*, LipM, dado que si bien realizan la misma actividad, la última posee una secuencia similar a lipoato proteína ligasas y una mayor especificidad de sustrato (Christensen y Cronan, 2010). La identidad con *T. cruzi* es del 68,3%.

Tabla 5.III. Comparación de los porcentajes de identidad entre las distintas enzimas involucradas en la síntesis y/o salvataje de AL de modelos conocidos y *T. brucei*. El análisis se realizó con el programa MegAlign. *La enzima con homología de secuencia a lipoato proteína ligasas no posee tal actividad (ver texto).

	<i>T. cruzi</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. cerevisiae</i> *	<i>H. sapiens</i>	<i>A. thaliana</i>
Octanoiltransferasas	68,3	27,6	12,3	23,1	27,2	27,0
lipoato sintasas	75,6	43,1	41,1	44,6	47,0	45,8
lipoato protein ligasas	48,8	25,3	19,9	19,4	19,3	17,8

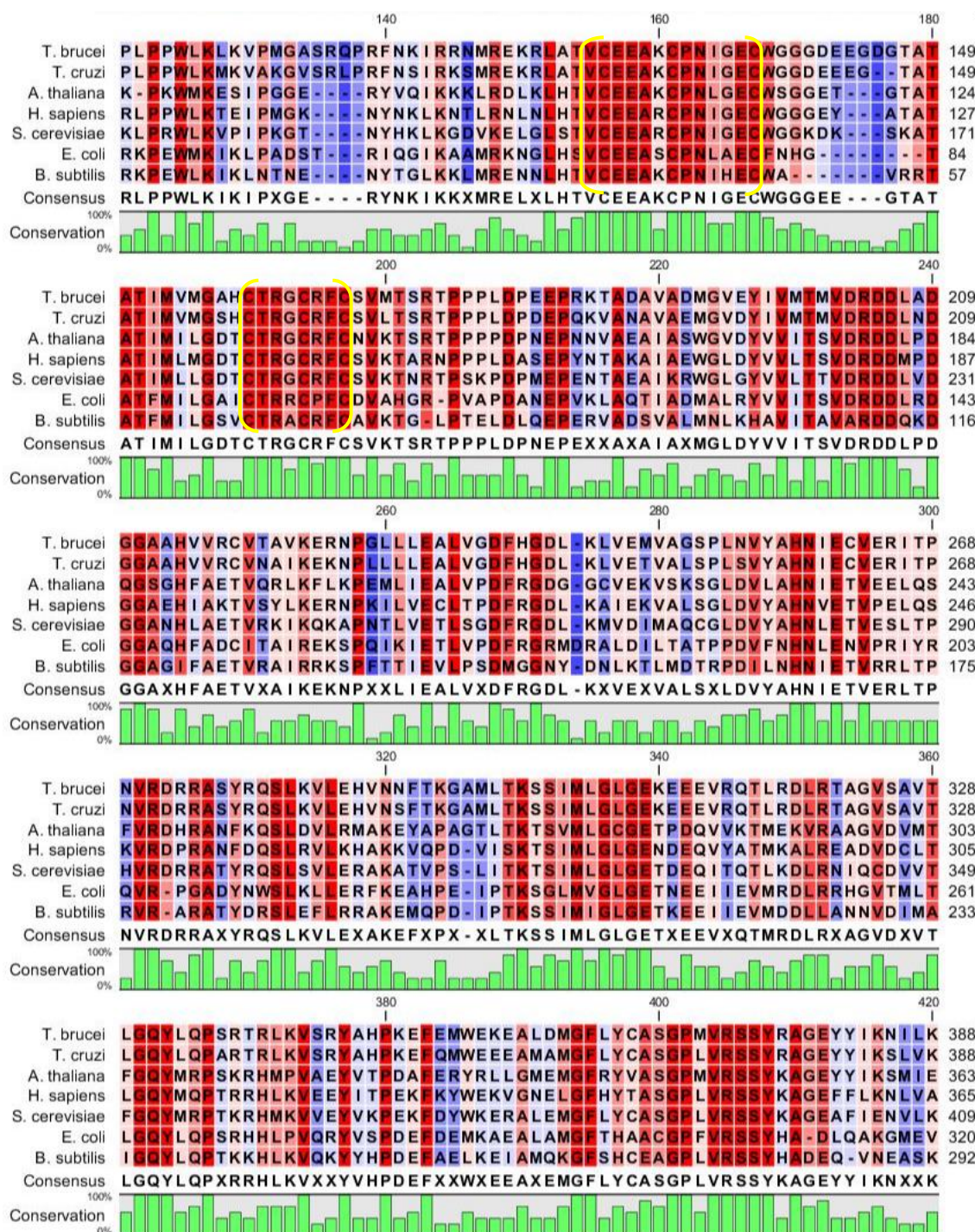


Figura 5.5. Análisis comparativo mediante el software CLC Sequence Viewer 6 de secuencias de lipato sintasas identificadas en organismos modelo y aquellas encontradas en *T. brucei* y *T. cruzi*. En color rojo se resaltan motivos, secuencias y residuos conservados en todos los casos. Recuadrados en amarillo se destacan los dos motivos de cisteína característicos de lipato sintasas (Jarrett, 2014): CXXCXXC y CXXXXCXXXXC.

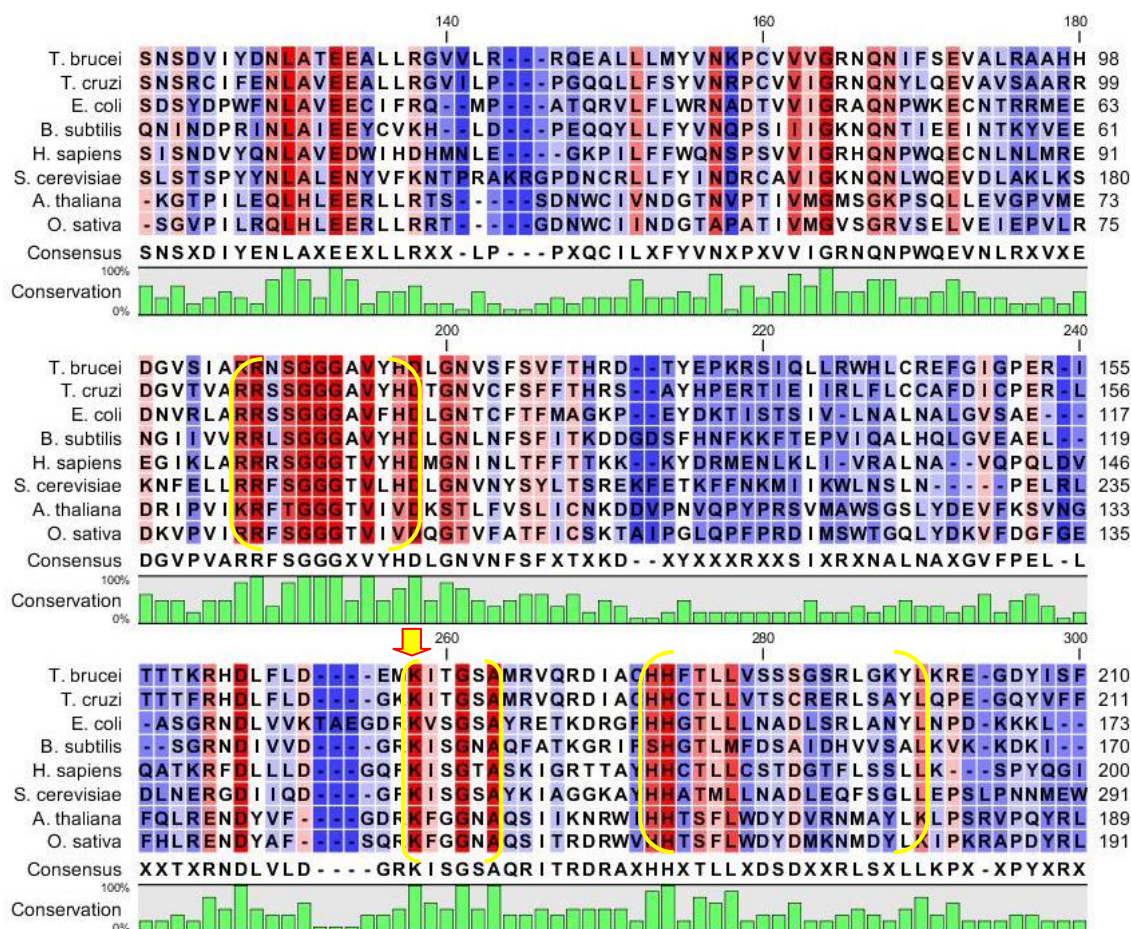


Figura 5.6. Análisis comparativo mediante el software CLC Sequence Viewer 6 de secuencias de lipoato proteína ligasas (y homólogas) identificadas en organismos modelo y aquellas encontradas en *T. brucei* y *T. cruzi*. En color rojo se resaltan motivos, secuencias y residuos conservados en todos los casos. Recuadrados en amarillo se destacan tres motivos característicos cuyas secuencias consenso son: **RRXXGGGXV(F/Y)HD**, **KhXGXA** y **HXX(L/M)LXXX(D/N)LXXLXXhL**, donde X, cualquier aminoácido; h, residuo hidrofóbico (Kim y col., 2005). Con una flecha amarilla se destaca el residuo conservado de lisina de las lipoato proteína ligasas (Schonauer y col., 2009).

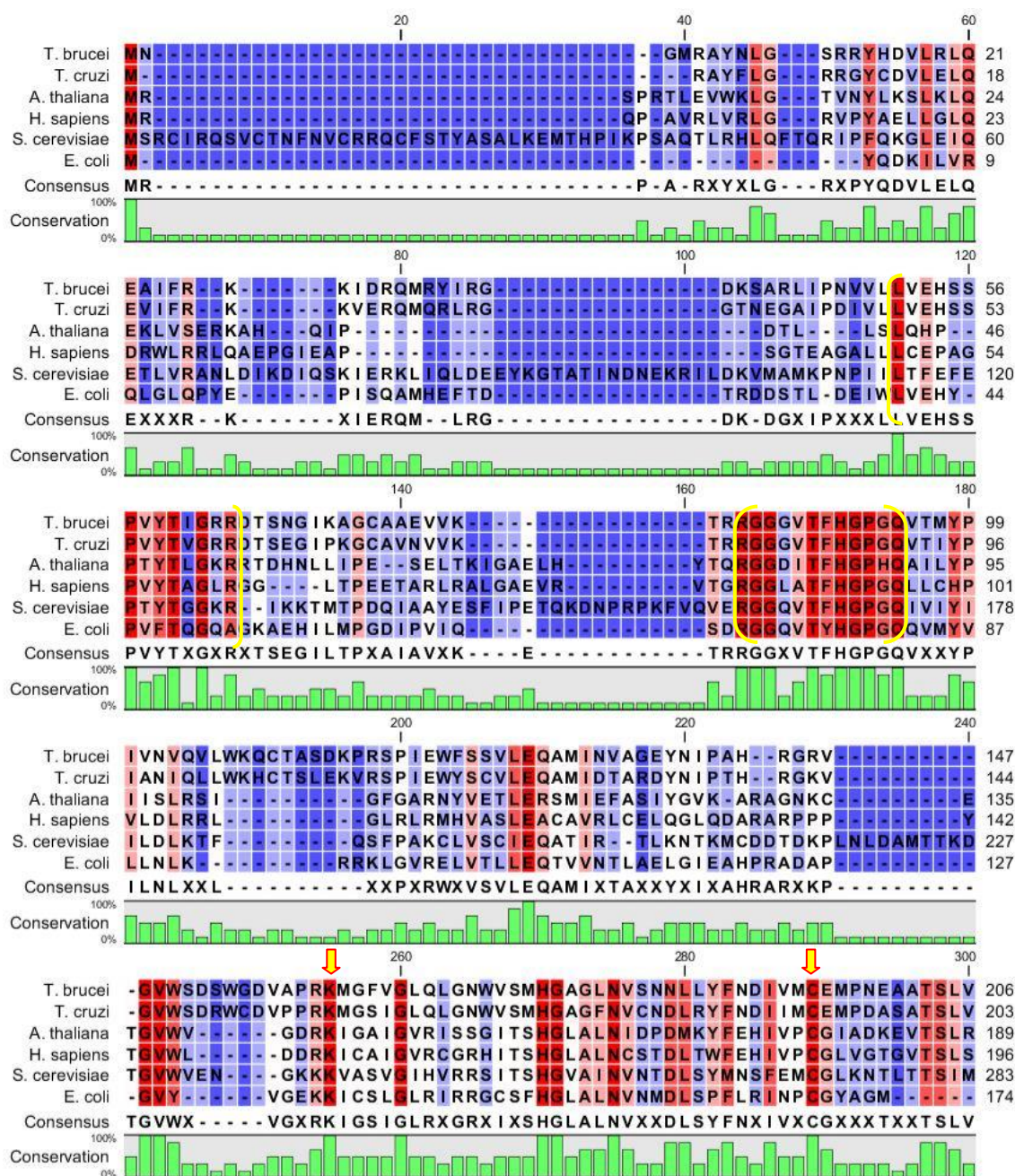


Figura 5.7. Análisis comparativo mediante el software CLC Sequence Viewer 6 de secuencias de octanoiltransferasas identificadas en organismos modelo y aquellas encontradas en *T. brucei* y *T. cruzi*. En color rojo y recuadrados en amarillo se resaltan residuos y motivos conservados, respectivamente. Con flechas se indican los residuos de lisina (K) y cisteína (C) característicos de octanoiltransferasas (Zhao y col., 2005; Ma y col., 2006).

Dado que el análisis *in silico* de TbLipT apoya la hipótesis de que sería una octanoiltransferasa, decidimos llevar adelante una serie de experimentos con el fin de comprobarlo. Para ello trabajamos con sistemas de expresión heteróloga, tanto

eucariotas (*S. cerevisiae*) como procariotas (*E. coli*). La primera aproximación experimental fue la realización de ensayos de reversión de fenotipo por complementación funcional en levaduras.

5.3.3. TbLipT complementa la función de Lip2 en levaduras mutantes

5.3.3.1. TbLipT revierte el fenotipo de crecimiento de mutantes *lip2* de levaduras

Siendo *S. cerevisiae* uno de los organismos eucariotas donde más se estudiaron los mecanismos de lipoilación de proteínas y dada la disponibilidad en nuestro laboratorio de cepas mutantes para dos de los tres genes involucrados en dichos mecanismos (*lip2* y *lip3*), comenzamos la caracterización funcional de la proteína codificada por el gen *TbLipT* estudiando su capacidad de revertir el fenotipo de crecimiento de la cepa mutante *lip2* de levadura en medios de cultivo específicos. Por otro lado, también estudiamos los efectos de la expresión de *TbLipT* en mutantes *lip3* con el objetivo de obtener información adicional sobre su funcionalidad.

Dado que en levaduras AL es cofactor de las enzimas PDH y KGDH, esenciales para la respiración celular, las cepas incapaces de sintetizarlo (mutantes *lip*) muestran un crecimiento nulo o muy disminuido en medios de cultivo suplementados con fuentes de carbono no fermentables como el glicerol (medio YPG) (Sulo y Martin, 1993; Marvin y col., 2001). Por otro lado, dichas mutantes tampoco poseen un CCG funcional al no poder lipoilar su proteína H, siendo incapaces de crecer en medios mínimos cuya única fuente de nitrógeno es glicina (Marvin y col., 2001), como por ejemplo YNBDGly (medio mínimo sin aminoácidos ni $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, conteniendo glucosa y glicina). Además de los medios de cultivo mencionados, y basándonos en los estudios de Marvin y col. (2001), utilizamos los medios YPE (etanol) e YPS (succinato), dado que aportan información complementaria, dependiendo de los metabolismos involucrados durante el crecimiento en cada uno de ellos.

El gen Tb927.11.9390 (*TbLipT*) fue amplificado desde ADN genómico de *T. brucei*, clonado en el vector pCR-Blunt II-TOPO y posteriormente subclonado en el vector para levaduras p426 GPD, que proporciona expresión constitutiva mediante el promotor de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. La construcción fue introducida en la cepa de levaduras YLR239C, mutante en *lip2*, resultando en la cepa *lip2/TbLipT*, y

en la cepa YJL046W, mutante *lip3*, resultando en la cepa *lip3/TbLipT*. Como control salvaje se utilizó la cepa isogénica BY4741.

Como puede observarse en la Figura 5.8A, *TbLipT* logró revertir la deficiencia de crecimiento producto de la mutación en *lip2*, mostrando un crecimiento similar a BY4741 en medio YPG; *TbLipT* no revirtió la deficiencia de una mutante *lip3* (cepa *lip3/TbLipT*) siendo ésta incapaz de crecer en YPG.

Como se describió en la Introducción General, las levaduras mutantes *lip2* son incapaces de octanoilar H, y por ende las subunidades E2, dado que H lipoilada (AL-H) es un intermediario necesario para su lipoilación (Schonauer y col., 2009). El hecho de que hayan sido complementadas exitosamente por *TbLipT* sugiere que el gen codifica efectivamente una octanoiltransferasa capaz de transferir residuos octanoilos desde octanoil-ACP a H. Octanoil-H es convertido en AL-H por la lipoato sintasa endógena (Lip5) dando lugar a un CCG funcional. Según la hipótesis desarrollada por Hermes y Cronan (2013), una vez octanoilada (o lipoilada), la proteína H actuaría como censor metabólico, permitiendo que Lip3 pueda octanoilar las subunidades E2 de PDH (E2p) y KGDH (E2k), utilizando como sustrato octanoil-CoA. El mismo Cronan (2016) también plantea que Lip3 podría ser una amidotransferasa. Las actividades enzimáticas de ambas deshidrogenasas permiten la utilización de fuentes de carbono no fermentables como el glicerol. Más aún, la no complementación de las mutantes *lip3* podría indicar que TbLipT es una octanoiltransferasa específica para la proteína H, tal como sucede con Lip2 en levaduras (Schonauer y col., 2009). Si TbLipT pudiera transferir residuos octanoilos a las subunidades E2 (como sucede, por ejemplo, en *E. coli*; Hassan y Cronan, 2011), debería revertir la deficiencia de las mutantes *lip3*, que sí son capaces de octanoilar H gracias a su Lip2 endógena. Una alternativa interesante sería que TbLipT actúe sólo sobre una de las dos subunidades E2 (además de H), como ocurre por ejemplo en *P. falciparum* (Wrenger y Müller, 2004) o en *A. thaliana* (Ewald y col., 2014a,b), en cuyo caso tampoco habría complementación de *lip3*.

En un segundo experimento, se utilizó el medio mínimo YNB DGly (Figura 5.8B). Aunque en este caso hay un crecimiento basal de las cepas mutantes y *lip3/TbLipT*, nuevamente la complementación de las mutantes *lip2* por *TbLipT* fue exitosa, creciendo las levaduras complementadas de manera similar a las salvajes. La recuperación de la capacidad de crecimiento puede interpretarse como una consecuencia

de la lipoilación de la proteína H de las levaduras por la acción de TbLipT sumada a la de Lip5 endógena, proporcionando un CCG funcional y permitiendo el uso de glicina como única fuente de nitrógeno. Nuevamente, *TbLipT* fue incapaz de complementar *lip3*.

Las subunidades E2 de PDH y KGDH, serían lipoiladas gracias a Lip3 endógena. Si bien las levaduras utilizan como fuente principal de energía la fermentación de glucosa cuando está disponible (Turcotte y col., 2009), una vez agotada deben recurrir a la respiración de productos no fermentables como aminoácidos presentes inicialmente en el medio o productos del mismo metabolismo de la glucosa, como etanol o acetato (Tahara y col., 2011). En este sentido, aunque no esenciales en una primera instancia, las enzimas PDH y KGDH funcionales serán necesarias para la viabilidad celular en la fase estacionaria de crecimiento (Tahara y col., 2011), por lo que la lipoilación de las subunidades E2 contribuye a la recuperación de la capacidad de crecimiento. Por ende, el hecho de que TbLipT no haya complementado a *lip3* es otro indicio en favor de que no actuaría sobre (ambas) subunidades E2.

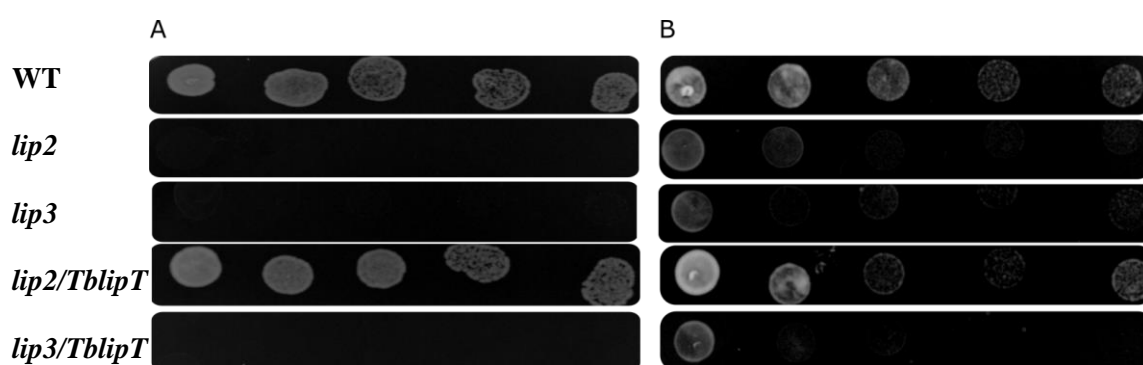


Figura 5.8. Experimentos de reversión de fenotipo de crecimiento deficiente de levaduras mutantes *lip2* y *lip3* por complementación funcional con *TbLipT*. **A.** Medio rico YPG. **B.** Medio mínimo YNB-DGly. WT, cepa salvaje BY4741; *lip2*, cepa mutante *lip2*; *lip3*, cepa mutante *lip3*; *lip2/TbLipT*, cepa mutante *lip2* transformada con el gen *TbLipT*; *lip3/TbLipT*, cepa mutante *lip3* transformada con el gen *TbLipT*.

Para poner a prueba la hipótesis de que TbLipT podría octanoilar específicamente solo una de las subunidades E2 de levaduras, se ensayó la capacidad de reversión de fenotipo en medio rico YPS. En este caso, el succinato es una fuente de carbono no fermentable pero además es un intermediario del ciclo de Krebs. Su presencia suple la ausencia de una KGDH funcional (Chen, 1997; Marvin y col., 2001). Por otro lado, el etanol (medio YPE) es una fuente de carbono no fermentable que además puede utilizarse para suplir la falta de PDH. El etanol es oxidado a acetaldehído,

por una alcohol deshidrogenasa, y luego éste es oxidado nuevamente generándose acetato, a través de una acetaldehído deshidrogenasa (Turcotte y col., 2009). Finalmente, una acetil-CoA sintetasa ATP dependiente convierte el acetato producido en acetil-CoA (Turcotte y col., 2009) permitiendo su ingreso en el ciclo de Krebs (Chen, 1997; Marvin y col., 2001). Estos medios son útiles para determinar la especificidad de sustrato de las enzimas encargadas de lipoilar las subunidades E2. Si una levadura mutante *lip3* es complementada por una enzima capaz de actuar tanto sobre las subunidades E2 de PDH (E2p) como de KGDH (E2k), habrá crecimiento en ambos medios; tal es el caso de la propia Lip3 endógena (Hermes y Cronan, 2013). Si hubiera especificidad sobre una de las E2, habría un crecimiento diferencial en medios YPS o YPE.

En el caso concreto de TbLipT, si es capaz de octanoilar H, y por consiguiente E2p y E2k son lipoiladas posteriormente por Lip3 endógena, las levaduras mutantes *lip2* complementadas podrán crecer en ambos medios. Esto es lo que se observa en la Figura 5.9. También se observa la carencia de crecimiento en ambos medios de la mutante *lip3* transformada con *Tb lipT*, lo que ratificaría, *a priori*, la incapacidad de lipoilar subunidades E2.

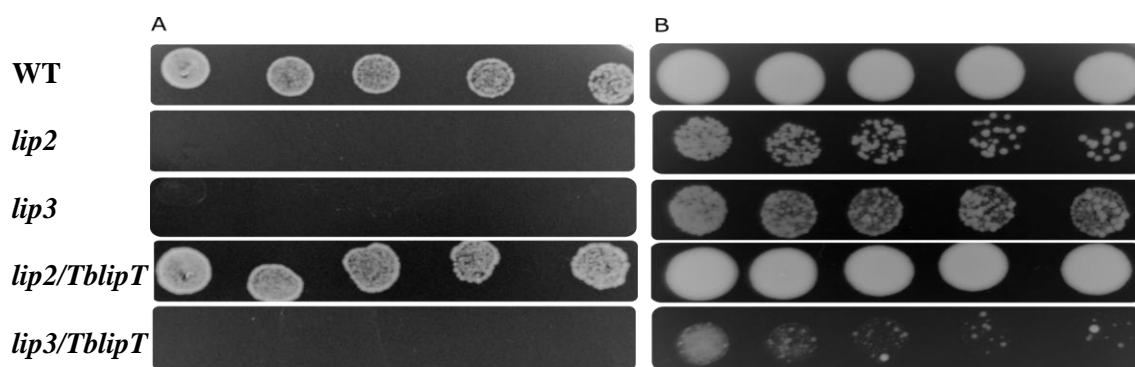


Figura 5.9. Experimentos de reversión de fenotipo de crecimiento deficiente de levaduras mutantes *lip2* y *lip3* por complementación funcional con *Tb lipT*. **A.** Medio rico YPS **B.** Medio rico YPE. WT, cepa salvaje BY4741; *lip2*, cepa mutante *lip2*; *lip3*, cepa mutante *lip3*; *lip2/Tb lipT*, cepa mutante *lip2* transformada con el gen *Tb lipT*; *lip3/Tb lipT*, cepa mutante *lip3* transformada con el gen *Tb lipT*.

5.3.3.2. La complementación con TbLipT produce la lipoilación de la subunidades E2 en mutantes *lip2*

La complementación con el gen *Tb lipT* y la consecuente recuperación de la capacidad de crecimiento de las levaduras mutantes *lip2* en medios de cultivo con

fuentes de carbono no fermentables o con glicina como única fuente de nitrógeno avalan la hipótesis de que TbLipT es una enzima con actividad octanoiltransferasa específica para la proteína H del CCG. Con el fin de revalidar estos resultados se realizaron western blots con anticuerpos anti-lipoamida a partir de extractos mitocondriales de proteínas de las cepas BY4741, *lip2*, *lip2/TbLipT* y *lip3/TbLipT* crecidas en YPD. Como muestra la Figura 5.10, la cepa *lip2* complementada con *TbLipT* presenta el mismo patrón de bandas que la cepa de tipo salvaje BY4741; observándose dos bandas de 52 kDa y 50 kDa correspondientes a ScE2p y ScE2k, respectivamente (Schonauer y col., 2009). Desafortunadamente no hemos podido detectar AL-H en ninguno de nuestros experimentos de western blot. Esta imposibilidad fue descrita por otros autores trabajando con *T. gondii* (Crawford y col., 2006) y con *E. coli* (Spalding y Prigge, 2009), y puede deberse a la muy baja concentración de esta proteína acilada, a un reconocimiento limitado del anticuerpo o a su pobre transferencia a las membranas de nylon. Incluso Spalding y Prigge (2009) obtuvieron señales muy bajas de AL-H (en relación a las AL-E2) en experimentos de marcación con [35 S]-lipoato en levaduras. Por el contrario, la mutante *lip2* y la cepa *lip3/TbLipT* no presentan proteínas lipoiladas.

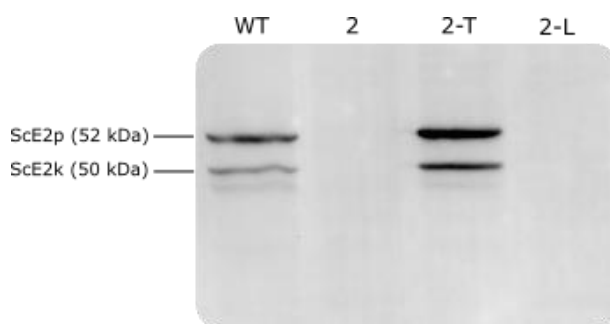


Figura 5.10. Patrón de bandas de proteínas lipoiladas en *S. cerevisiae* obtenido a partir de extractos mitocondriales de proteínas mediante western blot anti-lipoamida. WT, cepa salvaje BY4741; 2, cepa mutante *lip2*; 2-T, cepa mutante *lip2* transformada con *TbLipT*; 3-T, cepa mutante *lip3* transformada con *TbLipT*. Se sembró la misma cantidad de proteínas por calle.

Esta correlación entre capacidad de crecimiento y patrón de lipoilación es una fuerte evidencia a favor de la identidad propuesta para TbLipT. Para confirmarlo de forma fehaciente, decidimos complementar una cepa de *E. coli* (TM136) doble mutante para el gen de la lipoato proteína ligasa (*lplA*) y el de la octanoiltransferasa (*lipB*). De esta manera, dado que LipB octanoila tanto a H (si se encuentra inducida por la presencia de glicina) como a las subunidades E2 (Jordan y Cronan, 1997, 2003), tal estrategia nos permitiría revalidar la actividad de TbLipT y confirmar su especificidad al prescindir de la enzima Lip3 endógena de levaduras, que al actuar sobre las subunidades E2 puede enmascarar la potencial acción de TbLipT sobre las mismas.

5.3.3.3. TbLipT octanoila la subunidad E2p de *E. coli*

Se utilizó la cepa doble mutante TM136 de *E. coli*, la cual es incapaz de sintetizar AL *de novo* (*lipB*) y de rescatar AL exógeno (*lplA*). Para tratar de complementar esta deficiencia se subclonó el gen Tb927.11.9390 (*TbLipT*) en el vector de expresión pBluescript II KS, bajo el control del promotor *lac* inducible por IPTG. Cultivos en medio LB de las cepas DH5α (control positivo), TM136 (suplementando en este caso con glucosa 2%, acetato y succinato 0,5 mM) y TM136 complementada con *TbLipT* fueron inducidos con IPTG durante tres horas; posteriormente se cosecharon y prepararon extractos totales de proteínas a partir de los cuales se realizó un nuevo westernblot anti-lipoamida. En DH5α se observan dos bandas de 75 kDa y 50 kDa correspondientes a E2p y E2k, respectivamente (Figura 5.11). EcE2p es una proteína de 66 kDa aproximadamente, pero migra con un peso aparente mayor debido a la inusual unión del SDS a sus tres residuos lipoilados (Hassan y Cronan, 2011). Sorprendentemente, TbLipT indujo la lipoilación de EcE2p con el mismo patrón de banda doble con masa molecular aparente de 75 kDa. Este resultado estaría indicando que además de octanoilar la proteína H, TbLipT tiene como sustrato a E2p. Dicha especificidad no pudo apreciarse trabajando con levaduras debido a que –como se explicó más arriba– la Lip3 endógena octanoila ambas subunidades E2, enmascarando la acción de TbLipT. En el caso de la cepa mutante *lip3* complementada con *TbLipT* la banda correspondiente a E2p lipoilada pudo no haberse observado por la misma falta de sensibilidad descrita para el caso de AL-H.

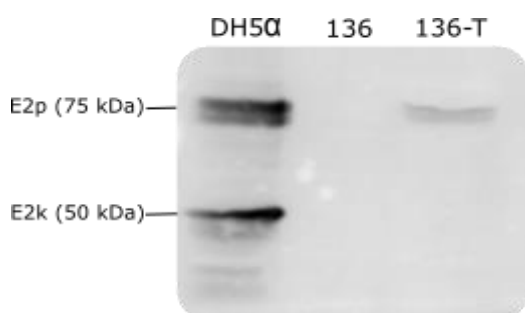


Figura 5.11. Patrón de bandas de proteínas lipoiladas en *E. coli* obtenido a partir de extractos totales de proteínas mediante western blot anti-lipoamida. 136, cepa TM136 doble mutante *lipB* *lplA*⁻; 136-T, cepa TM136 complementada con *TbLipT*. En todos los casos se sembró la misma cantidad de proteínas por calle.

Hasta donde conocemos, este sería el segundo caso reportado de una octanoiltransferasa capaz de discriminar entre subunidades E2. Una situación particular ocurre en parásitos apicomplejos dado que PDH se encuentra exclusivamente en apicoplastos y es lipoilada sólo mediante síntesis *de novo* (Crawford y col., 2006; Storm

y Müller, 2012); por ende la octanoiltransferasa es específica de E2p puesto que es –a diferencia de *T. brucei*– su único sustrato. En plantas y algas ocurre algo similar, ya que poseen una PDH mitocondrial y una isoenzima plastídica (Crawford y col., 2006). Sólo en el caso puntual de *Arabidopsis thaliana* se ha reportado un escenario con similitudes al encontrado en *T. brucei*, donde existiría discriminación en la octanoilación de subunidades E2. En esta planta se han caracterizado dos octanoiltransferasas plastídicas (LIP2p y LIP2p2) capaces de octanoilar indistinta y exclusivamente E2p (Ewald y col., 2014a). Pero más importante aún, en mitocondrias, una tercer octanoiltransferasa, LIP2 (Wada y col., 2001), octanoilaría específicamente E2k a partir de H, mientras que H y E2p serían sustrato de la lipoato proteína ligasa LPLA, una enzima que utiliza octanoil-nucleósido monofosfato como dador de grupos octanoilos (Ewald y col., 2014b). En las hojas, LIP2 sería capaz de octanoilar también H a partir de octanoil-ACP (Ewald y col., 2014b).

Volviendo a analizar la Figura 5.10, puede observarse que en *lip2/TbLipT*, la banda correspondiente a E2p es más intensa con respecto a la de E2k y a ambas bandas de la cepa salvaje. El hecho de que la cepa mutante *lip3* de *S. cerevisiae* complementada con *TbLipT* no haya podido crecer en YPS, donde TbLipT octanoilaría H y E2p y el succinato supliría la falta de KGDH funcional podría explicarse, al menos en parte, por un bajo nivel de expresión y/o lipoilación de ScE2p. KGDH, además de participar en la respiración celular, cumple un rol importante en la función global de la mitocondria, por lo que su presencia y funcionalidad son imprescindibles, pese a la suplementación del medio con succinato. Esto ha sido reportado en levaduras (Kaufman y col., 2000; Sato y col., 2002) e incluso en tripanosomas (Sykes y Hajduk, 2013). En ambos casos E2k se encontró asociada al ADN mitocondrial (en los nucleoides de levaduras y en el kinetoplasto de tripanosomas) y se cree que jugaría un rol en la segregación adecuada del mismo durante la división celular.

En su conjunto, estas evidencias experimentales demuestran que TbLipT es una enzima con actividad octanoiltransferasa, que utiliza como sustrato la proteína H del complejo CCG y la subunidad E2p del complejo piruvato deshidrogenasa.

6. Capítulo III

Identificación de una enzima de *Trypanosoma brucei* con similitud a lipoato ligasas. Caracterización parcial de su funcionalidad mediante complementación de mutantes de levaduras

6.1. Introducción

Continuando con la caracterización de posibles enzimas involucradas en el metabolismo de lipoilación de proteínas se estudió el gen de *T. brucei* con homología de secuencia a lipoato proteína ligasas, TbLipL. Esta clase de enzimas pertenecen a la superfamilia Pfam PF03099, que incluye tanto lipoato proteína ligasas, como octanoiltransferasas, amidotransferasas e incluso biotina proteína ligasas (Christensen y col., 2011; Cronan, 2016). Es decir que si bien comparten características estructurales y cierto grado de similitud de secuencia (Reche, 2000), estas enzimas poseen funciones muy diversas. Las lipoato proteína ligasas son las encargadas de ligar AL recuperado por la vía de salvataje, la cual consta de dos pasos: activación de AL libre por adenilación (producción de AL-AMP) y posterior ligación a la subunidad enzimática correspondiente (Green y col., 1995; Morris y col., 1995). Algunas ligasas como LplA de *Escherichia coli* (Morris y col., 1994, 1995), LplJ de *Bacillus subtilis* (Martin y col., 2011) o LplA1 y LplA2 de *Plasmodium falciparum* (Storm y Müller, 2012) son bifuncionales, capaces de catalizar ambos pasos, mientras que otras son bipartitas, siendo el ejemplo más estudiado LplA y LplB de *Thermoplasma acidophilum* (Kim y col., 2005; Christensen y Cronan, 2009). También encontramos enzimas que sólo ligan AL, necesitando de una enzima activante de lipoato; tal es el caso de bLT de *Bos Taurus* y ligasas de mamíferos en general, incluyendo –al menos *in vitro*– LIPT1 humana (Fujiwara y col., 2007) y probablemente LPLA de *Arabidopsis thaliana* (Ewald y col., 2014b). Por otro lado, LipL de *B. subtilis*, anotada inicialmente como lipoato proteína ligasa por su homología de secuencia, demostró tener actividad amidotransferasa, participando en la transferencia de residuos octanoilos desde la proteína H del CCG a las subunidades E2 de los complejos α -OADH (Christensen y col., 2011). Otro caso de conservación de estructura y cambio de función es el de Lip3 en levaduras. Esta enzima sería una octanoil-CoA:proteína transferasa, que también

cataliza la transferencia de residuos octanoilos a las subunidades E2 pero utilizando octanoil-CoA como dador de grupos octanoilos, en lugar de octanoil-H (Hermes y Cronan, 2013); aunque no se descarta que sea una amidotransferasa como LipL (Cronan, 2016). Los miembros más distantes filogenéticamente dentro de esta superfamilia son las biotina proteína ligasas que, utilizando un mecanismo análogo al de activación y ligación de AL, catalizan la biotinilación de subunidades enzimáticas (Reche, 2000).

En base a estos antecedentes emprendimos un análisis *in silico* en primera instancia y la caracterización funcional posterior del gen Tb927.8.630 (*TbLipL*) de *T. brucei*, cuya secuencia presenta homología con lipoato proteína ligasas. Como se demostró en el Capítulo I de esta tesis en *Trypanosoma cruzi* y según las evidencias aportadas en *T. brucei* por Stephens y colaboradores (2007), previamente descriptas en la Introducción General, los tripanosomátidos carecerían de una vía de salvataje de AL, por lo que sería de esperar que TbLipL cumpla una función en la vía de síntesis *de novo* de AL. Recordando también que en el Capítulo II se demostró que TbLipT es una octanoiltransferasa que transfiere grupos octanoilos desde octanoil-ACP a la proteína H y la subunidad E2 del complejo piruvato deshidrogenasa (E2p), cabe especular que TbLipL podría intervenir en la octanoilación de las subunidades E2 de los complejos α -OADH restantes, KGDH y/o BCDH, ya sea actuando como amidotrasferasa (utilizando octanoil-H como sustrato) o como una segunda octanoiltransferasa, utilizando octanoil-ACP, octanoil-CoA, octanoil-AMP o alguna otra forma de octanoilo activado. Puede incluso especularse que sea capaz de transferir lipoilos desde lipoil-H o lipoil-E2p.

6.2. Objetivos específicos

- Analizar bioinformáticamente la secuencia Tb927.8.630 (*TbLipL*) y predecir la estructura y función de la proteína TbLipL de *T. brucei*.
- Caracterizar funcionalmente la enzima TbLipL, ortóloga de lipoato proteína ligasas.
- Proponer un modelo para el mecanismo de síntesis *de novo* de AL en tripanosomas.

6.3. Resultados y discusión

6.3.1. Análisis bioinformático de una probable lipoato proteína ligasa de *T. brucei*

Como hemos descripto en el capítulo anterior, la secuencia Tb927.8.630 (*TbLipL*) se utilizó como semilla en un BLASTP global que permitió la construcción de un árbol filogenético. Las enzimas de tripanosomátidos con homología a lipoato proteína ligasas agruparon próximas al clado de los metazoos, incluyendo *Homo sapiens* (Figura 5.3, Capítulo II). *TbLipL* codifica para una proteína de 512 aminoácidos y 57.053 Da, de posible localización mitocondrial. El análisis de la secuencia aminoacídica mediante el programa Swiss-Model predijo una función y estructura proteica característica de lipoato proteína ligasa (Tabla 5.III, Capítulo II).

El multialineamiento (Figura 5.5, Capítulo II) mostró motivos y residuos altamente conservados y característicos de la superfamilia de enzimas Pfam PF03099 (Christensen y col., 2011; Cronan, 2016). TbLipL posee significativos grados de identidad en la region N-terminal con las correspondientes regiones de LplA de *E. coli* (35%) y *Homo sapiens* (31%) (Tabla 5.III). Dicha región corresponde –en la mayoría de las ligasas estudiadas hasta el momento- al dominio encargado de transferir el grupo lipoilo, mientras que el extremo C-terminal de la enzima está involucrado en la activación de AL (Fujiwara y col., 2010; Cronan, 2016). En el caso particular de la bacteria del suelo *Streptomyces coelicolor* los dominios C-terminal y N-terminal se encuentran permutados (Cao y Cronan, 2015).

Es evidente la imposibilidad de predecir la actividad enzimática de este tipo de proteínas solo por la similitud de secuencia primaria e incluso por conservación de motivos estructurales (Cronan, 2016). Por tal motivo hemos llevado a cabo experimentos de complementación de mutantes de levaduras, con la idea de ganar información respecto a su funcionalidad.

6.3.2. TbLipL complementa parcialmente la función de Lip3 en levaduras mutantes

6.3.2.1. TbLipL no revierte el fenotipo de crecimiento de mutantes *lip3* en YPG

Se llevaron a cabo experimentos de reversión de fenotipo de levaduras mutantes para el gen *lip3* (cepa YJL046W o *lip3*) en los medios YPG, YNBDGly, YPE e YPS, utilizando el mismo diseño experimental descrito en el Capítulo II. Se construyeron así las cepas *lip2/TbLipL* y *lip3/TbLipL*. Nuevamente se utilizó como control la cepa salvaje isogénica BY4741. A los fines de una mejor comprensión y de facilitar un análisis integrador, en las figuras que se muestran a continuación se exponen los resultados obtenidos complementando tanto con *TbLipL* como con *TbLipT* (ya expuestos en el Capítulo II).

Como puede observarse en la Figura 6.1A, *TbLipL* no logró revertir la deficiencia de crecimiento producto de la mutación en *lip3* en medio YPG; *TbLipL* tampoco revirtió la deficiencia de la mutante *lip2* (cepa *lip2/TbLipL*), resultando ambas cepas incapaces de crecer en este medio. Una primera interpretación de este resultado indicaría que TbLipL no posee actividad octanoiltransferasa sobre H, ya sea utilizando octanoil-ACP u octanoil-CoA como sustrato, y tampoco actividad amidotransferasa utilizando octanoil-H/lipoil-H sobre ambas E2, aunque no se descarta que sea capaz de acilar una de las dos subunidades E2.

6.3.2.2. TbLipL revierte el fenotipo de crecimiento de mutantes *lip3* en YNBDGly

TbLipL revirtió el fenotipo de *lip3* en el medio YNBDGly con crecimiento comparable al de la correspondiente cepa salvaje (BY4741) (Figura 6.1B). Este fenotipo puede explicarse sólo si se recupera una KGDH funcional. Dado que el medio YNBDGly tiene glucosa como fuente de carbono, las levaduras *lip3* pueden crecer inicialmente fermentando dicho sustrato (Turcotte y col., 2009), y utilizando glicina como fuente de nitrógeno a través de un CCG funcional gracias a la Lip2 endógena. Estos procesos metabólicos explican también el mayor crecimiento basal de *lip3* respecto de *lip2* (que carece de Lip2 funcional). No obstante, una vez fermentada toda la glucosa disponible, las levaduras necesitan recurrir a la respiración de productos no fermentables como aminoácidos y productos del mismo metabolismo de la glucosa, como etanol (Tahara y col., 2011). Es entonces cuando la capacidad de realizar el ciclo

de Krebs gracias a una KGDH funcional y al etanol acumulado permite a la cepa *lip3/TbLipL* (y a BY4741) continuar creciendo por periodos más prolongados (Tahara y col., 2011). La funcionalidad de KGDH podría explicarse si TbLipL es capaz de octanoilar (o lipoilar) E2k. Dado que no fue capaz de complementar una mutante *lip2*, deberíamos descartar la posibilidad de que sea capaz de acilar la proteína H.

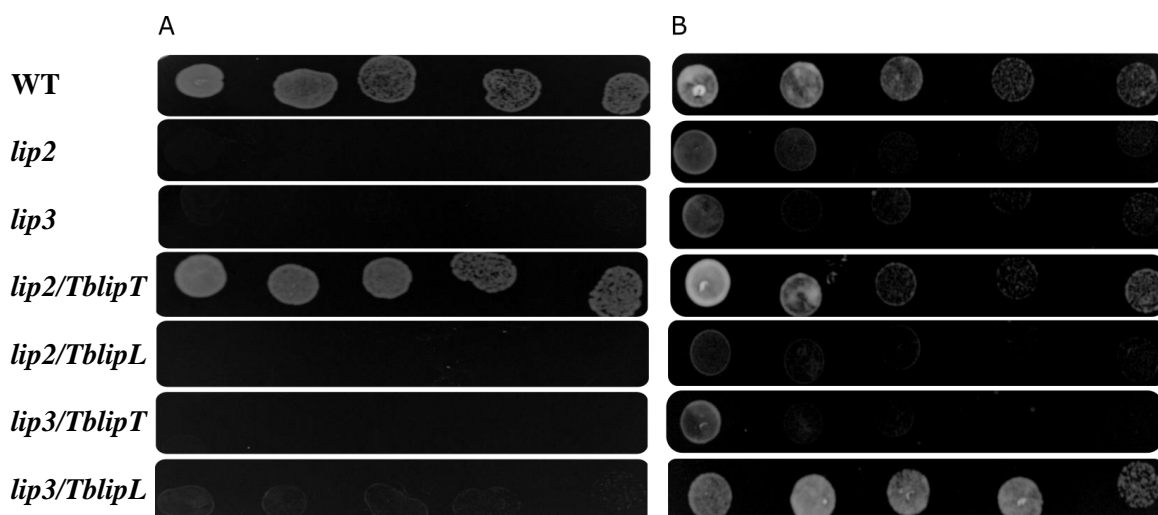


Figura 6.1. Experimentos de reversión de fenotipo de crecimiento deficiente de levaduras mutantes *lip2* y *lip3* por complementación funcional con *TbLipT* y *TbLipL*. **A.** Medio rico YPG. **B.** Medio mínimo YNB-DGly. WT, cepa salvaje BY4741; *lip2*, cepa mutante *lip2*; *lip3*, cepa mutante *lip3*; *lip2/TbLipT*, mutante *lip2* transformada con el gen *TbLipT*; *lip2/TbLipL*, mutante *lip2* transformada con el gen *TbLipL*; *lip3/TbLipT*, mutante *lip3* transformada con el gen *TbLipT*; *lip3/TbLipL*, mutante *lip3* transformada con *TbLipL*.

6.3.2.3. TbLip3 revierte el fenotipo de crecimiento de mutantes *lip3* en YPE

Posteriormente se crecieron las cepas en los medios YPS e YPE. Los resultados obtenidos en YPS (Figura 6.2A) son coherentes con la hipótesis planteada. Recordando que el succinato del medio es una fuente de carbono no fermentable y sirve además para suplir la falta de KGDH funcional (Chen, 1997; Marvin y col., 2001), si TbLipL octanoila o lipoila E2k, la cepa *lip3/TbLipL* sigue careciendo de una PDH funcional y no es capaz de crecer respirando el succinato. Por el contrario, sería de esperar que la mutante complementada crezca en YPE, donde el etanol supliría la falta de PDH (Chen, 1997; Marvin y col., 2001) y TbLipL permitiría la funcionalidad de KGDH. Esto fue lo que se observó en dicho medio (Figura 6.2B). En el caso de la cepa *lip2* complementada por *TbLipL*, sería de esperar que no crezca en YPS ni en YPE, ya que TbLipL no acilaría H y Lip3 endógena no dispondría de octanoil-H para octanoilar ambas subunidades E2.

La falta de crecimiento de *lip2/Tb lipL* fue nuevamente coherente con nuestra hipótesis (Figura 6.2A y B).

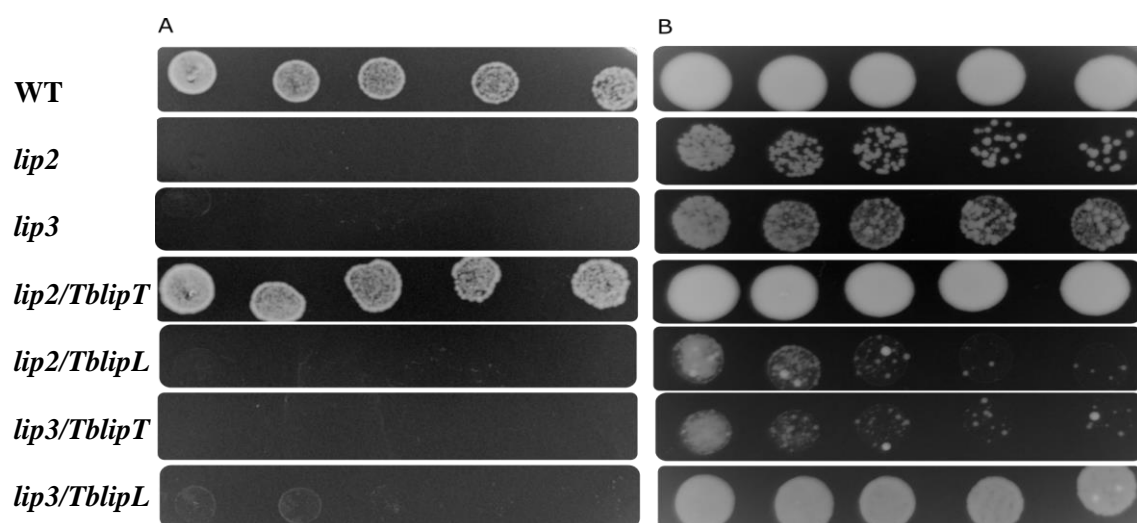


Figura 6.2. Experimentos de reversión de fenotipo de crecimiento deficiente de levaduras mutantes *lip2* y *lip3* por complementación funcional con *Tb lipT* y *Tb lipL*. **A.** Medio rico YPS. **B.** Medio rico YPE. WT, cepa salvaje BY4741; *lip2*, cepa mutante *lip2*; *lip3*, cepa mutante *lip3*; *lip2/Tb lipT*, mutante *lip2* transformada con el gen *Tb lipT*; *lip2/Tb lipL*, mutante *lip2* transformada con el gen *Tb lipL*; *lip3/Tb lipT*, mutante *lip3* transformada con el gen *Tb lipT*; *lip3/Tb lipL*, mutante *lip3* transformada con *Tb lipL*.

Además de la complementación de *lip3* por *Tb lipL*, donde *lip3/Tb lipL* muestra un crecimiento similar en etanol al de la cepa salvaje BY4741 y la mutante complementada *lip2/Tb lipT*, se observa que las cepas mutantes *lip2* y –especialmente– *lip3* presentan un crecimiento basal importante. Más aún, las mismas cepas mutantes, complementadas de forma cruzada (*lip2/Tb lipL* y *lip3/Tb lipT*), presentan un crecimiento disminuido respecto de las cepas sin complementar. La dificultad de interpretación de estas observaciones, sumado a la importancia que podrían tener en la comprensión del sistema, nos llevó a plantear el mismo experimento suplementando el medio YPE con AL 50 μ M. Esta estrategia responde también al objetivo de dilucidar si la acilación específica de E2k por parte de TbLipL se debe a una actividad octanoiltransferasa, amidotransferasa o incluso ligasa.

Como se muestra en la Figura 6.3A, BY4741, *lip2/Tb lipT* y *lip3/Tb lipL* volvieron a crecer, y la cepa *lip2/Tb lipL* incrementó su crecimiento, tanto con respecto a *lip2* como con respecto a su propio comportamiento en YPE sin suplementar. Esto sugiere que TbLipL tendría actividad ligasa. La mutante *lip2* complementada con *Tb lipL* crece entonces respirando el etanol gracias a una KGDH funcional resultante de

la actividad ligasa de TbLipL sobre E2k. Si bien la mayoría de las lipoato proteínas ligasas caracterizadas son promiscuas, existen antecedentes de este tipo de enzimas con especificidad de sustrato. Tal es el caso de LPLA de *A. thaliana*, que actúa sobre H y E2p (Ewald y col., 2014b) o LplA1 y LplA2 del parásito *P. falciparum*, específicas de H, E2k y E2b (Storm y Müller, 2012). Decidimos ensayar si se observaría también un efecto suplementando el medio YPE con octanoato 50 μ M, ya que algunas lipoato proteína ligasas son capaces de utilizar también ácido octanoico libre (Hermes y Cronan, 2013; Ewald y col., 2014). Como se observa en la Figura 6.3B, el octanoato no tuvo efecto, creciendo todas las cepas como en el medio YPE sin suplementar. Es decir que TbLipL tendría actividad ligasa específica para AL.

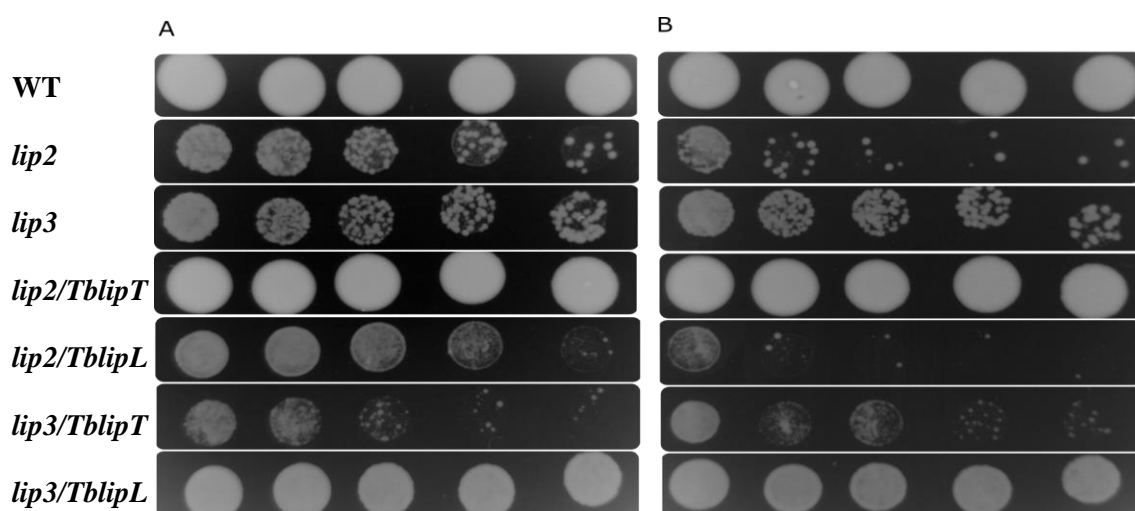


Figura 6.3. Experimentos de reversión de fenotipo de crecimiento deficiente de levaduras mutantes *lip2* y *lip3* por complementación funcional con *Tb lipT* y *Tb lipL*. **A.** Medio rico YPE + AL 50 μ M. **B.** Medio rico YPE + octanoato 50 μ M. WT, cepa salvaje BY4741. WT, cepa salvaje BY4741; *lip2*, cepa mutante *lip2*; *lip3*, cepa mutante *lip3*; *lip2/Tb lipT*, mutante *lip2* transformada con el gen *Tb lipT*; *lip2/Tb lipL*, mutante *lip2* transformada con el gen *Tb lipL*; *lip3/Tb lipT*, mutante *lip3* transformada con el gen *Tb lipT*; *lip3/Tb lipL*, mutante *lip3* transformada con *Tb lipL*.

En su conjunto, todos estos resultados apoyan la hipótesis de que TbLipL es una enzima involucrada en la lipoilación de la subunidad E2 de KGDH.

Dado que *TbLipL* no fue capaz de complementar a *lip2* en ningún medio de cultivo, a excepción de YPE suplementado con AL (aunque de forma parcial), se deduce que TbLipL necesita de H octanoilada (o lipoilada) para actuar, por lo que su actividad (principal) sería amidotransferasa u octanoil-CoA:proteína transferasa; por otro lado, es capaz de ligar AL libre (pero no octanoato) a E2k, demostrando tener actividad ligasa, siendo esta última residual o secundaria. Tal actividad puede explicarse considerando la posibilidad de que esta enzima haya evolucionado a partir de un antecesor lipoato proteína ligasa, ya que una proteína puede adquirir una segunda función (conocida como *moonlighting*), sin perder necesariamente la primera (Cronan, 2016). Lo mismo ocurriría con LIPT1 en humanos y quizá también con Lip3 en levaduras, según lo descrito por este mismo autor. LIPT1 sería una amidotransferasa que además posee actividad lipoiltransferasa (aunque no es capaz de activar lipoato) y Lip3 sería también una amidotransferasa que además posee la capacidad de octanoilar subunidades E2 a partir de octanoil-CoA (Cronan, 2016). En el caso de TbLipL, la actividad ligasa es específica para AL.

6.3.2.4. La complementación con TbLipL produce la lipoilación de E2k en mutantes *lip3*

Como en el caso de *TbLip2*, con el fin de revalidar los resultados precedentes se realizaron western blots con anticuerpos anti-lipoamida a partir de extractos mitocondriales de proteínas de las cepas salvajes, mutantes y complementadas, crecidas en YNBDGly o YPD. Como muestra la Figura 6.4A, en YNBDGly la cepa *lip2* complementada con *TbLipT* presenta el mismo patrón de bandas que la cepa salvaje BY4741, observándose dos bandas de 52 kDa y 50 kDa correspondientes a ScE2p y ScE2k, respectivamente (Schonauer y col., 2009). En el caso de *lip3/TbLipL* se observa una única banda tenue de 50 kDa que corresponde a ScE2k, lo cual confirmaría nuestra hipótesis sobre la función y especificidad de TbLipL. Como explicamos en el Capítulo II de esta tesis, desafortunadamente no logramos detectar AL-H en ninguno de nuestros experimentos de western blots. En los extractos realizados a partir de cultivos en YPD no fue posible detectar proteínas lipoiladas con la excepción de BY4741 y *lip2/TbLipT* (Figura 6.4B). Esto podría deberse a una regulación negativa por glucosa de la subunidad H, que impediría la lipoilación de E2 en cantidades compatibles con la sensibilidad del western blot. En el medio YNBDGly, la ausencia de fuentes de

nitrógeno, con excepción de la glicina, induce el CCG, incluyendo la proteína H (Nagarajan y Storm, 1997).

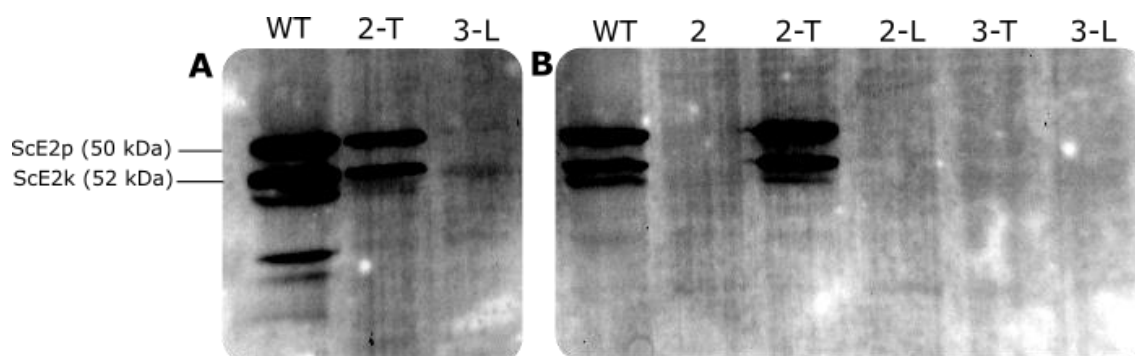


Figura 6.4. Patrón de bandas de proteínas lipoiladas en *S. cerevisiae* obtenido a partir de extractos mitocondriales de proteínas mediante western blot anti-lipoamida. **A.** Medio mínimo YNB DGly. **B.** Medio rico YPD. WT, cepa salvaje BY4741; 2-T, cepa mutante *lip2* transformada con *TbLipT*; 3-L, cepa mutante *lip3* transformada con *TbLipL*; 2, cepa mutante *lip2*; 3-T, cepa mutante *lip3* transformada con *TbLipT*; 3-L, cepa mutante *lip3* transformada con *TbLipL*. En todos los casos se sembró la misma cantidad de proteínas por calle.

Esta nueva correlación entre capacidad de crecimiento y patrón de lipoilación es una evidencia importante a favor de la identidad propuesta para TbLipL. Intentamos complementar la cepa TM136 de *E. coli*, doble mutante *lplA⁻lipB⁻*, y TM131, doble mutante *lplA⁻lipA⁻*, utilizando la misma estrategia experimental que con TbLipT. Desafortunadamente, no logramos la complementación de ninguna de las cepas de *E. coli*, ni la detección de bandas lipoiladas en western blots. Según nuestra hipótesis de trabajo sería de esperar la aparición de una banda de 50 kDa correspondiente a EcE2k. Esta ausencia podría deberse a un exiguo reconocimiento de TbLipL sobre la subunidad enzimática de *E. coli*, dado que dicho organismo dista filogenéticamente aún más de *T. brucei* que *S. cerevisiae*, donde el reconocimiento también fue pobre (Figura 6.4). Pero fundamentalmente, la carencia de proteína H, y por ende de acil-H en *E. coli*, apoya la hipótesis de que TbLipL pueda actuar como amidotransferasa.

7. Conclusiones

Modelo de síntesis de AL y lipoilación de proteínas propuesto para tripanosomas

Teniendo en cuenta los resultados expuestos y las conclusiones obtenidas en el Capítulo II de esta tesis, a saber, que TbLipT es una octanoiltransferasa capaz de octanoilar tanto la proteína H del CCG como la subunidad E2 del complejo PDH (E2p), sería de esperar que la enzima TbLipL sea la encargada de octanoilar (y/o lipoilar) la subunidad E2 de KGDH (E2k) en *T. brucei*. Efectivamente, los experimentos desarrollados durante el Capítulo III sugieren que TbLipL transfiere residuos octanoilos (o lipoilos) específicamente a E2k. Además se observó que necesita de H octanoilada (o lipoilada) para actuar sobre E2k. No obstante, no puede dilucidarse a partir de estos resultados si TbLipL es una amidotransferasa que utiliza H-oct o H-lip como sustrato (como LipL en *B. subtilis*; Christensen y col., 2011) o si utiliza grupos octanoilos previamente activados (como podría ser el caso de Lip3 en levaduras; Hermes y Cronan, 2013). Al respecto, cabe mencionar que el comportamiento mostrado por TbLipL es análogo al de BsLipL, observado por Hermes y Cronan (2013), en cuanto a que ambas enzimas fueron capaces de complementar levaduras mutantes *lip3* pero no mutantes *lip2*.

Por otro lado, encontramos que TbLipL es capaz de ligar y utilizar AL libre cuando está presente en el medio. Esta actividad ligasa residual o secundaria sería producto de la evolución de la enzima a partir de una lipoato proteína ligasa ancestral (Cronan, 2016). Esta hipótesis es coherente con la presencia en la secuencia aminoacídica de TbLipL de motivos conservados y, más aún, del residuo catalítico de lisina, característicos de las lipoato proteína ligasas –y de la familia Pfam PF03099 en general- (Figura 5.5, Capítulo II). Curiosamente, Hermes y Cronan (2013) también observaron que *BsLipL* es capaz de complementar levaduras mutantes *lip2* en YPE si se suplementa el medio con octanoato (en vez de lipoato) libre, revirtiendo parcialmente la deficiencia de crecimiento. Sin embargo, los autores sugieren que en este caso y bajo estas condiciones Lip3 (o una enzima desconocida) produciría octanoil-H, a partir del cual LipL transferiría los residuos octanoilos a las subunidades E2.

Sintetizando las conclusiones expuestas para cada capítulo, proponemos que los tripanosomas carecen de una vía de salvataje de AL libre y lipoilan sus proteínas

mediante la síntesis *de novo*. En esta vía, una octanoiltransferasa TbLipT transfiere residuos octanoilos desde octanoil-ACP a la proteína H del complejo de clivaje de glicina y a la subunidad E2 de PDH. Una ligasa/amidotransferasa TbLipL octanoila las subunidades E2 de KGDH y presumiblemente -dado que no está presente en levaduras- del complejo α -cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada, a partir de un dador de octanoilos aún no caracterizado. Una tercera enzima identificada bioinformáticamente, TbLipS, de actividad lipoato sintasa y altamente conservada, catalizaría la inserción de dos átomos de azufre sobre los grupos octanoilos, ya incorporados a H, E2k y E2p (y probablemente, E2b), convirtiéndolas en las proteínas lipoiladas (Figura 7.1). Una alternativa (Figura 7.2) contempla la posibilidad de que TbLipL transfiera grupos lipoilos desde lipoil-H y, en forma secundaria, AL libre.

La vía de lipoilacion es esencial y ha sido químicamente validada (Capítulo I) como blanco quimioterapéutico.

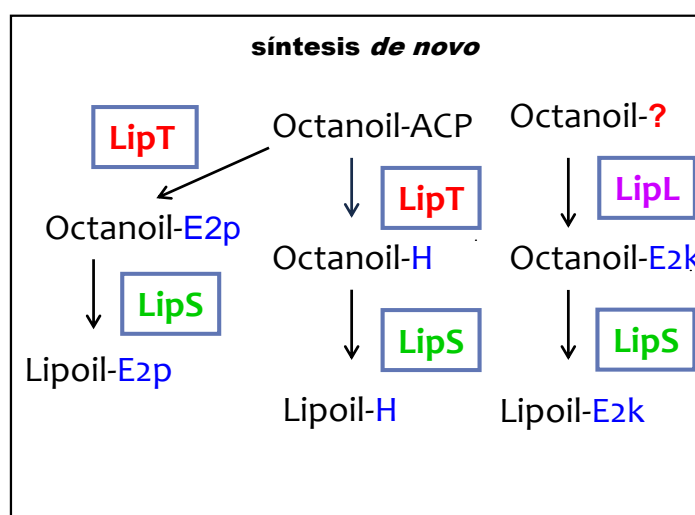
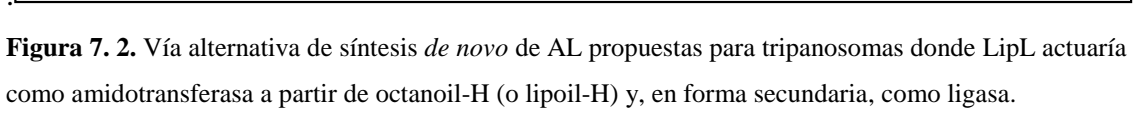


Figura 7. 1. Una de las vías de síntesis *de novo* de AL propuestas para tripanosomas donde LipL actuaría como amidotransferasa a partir de un dador de lipoato aún no caracterizado.



8. Bibliografía

- Allary, M., Lu, J. Z., Zhu, L. y Prigge, S. T. (2007) Scavenging of the cofactor lipoate is essential for the survival of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*, 63(5), 1331-1344.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25(17), 3389-3402.
- Barrett, M. P., Burchmore, R. J., Stich, A., Lazzari, J. O., Frasch, A. C., Cazzulo, J. J. y Krishna, S. (2003) The trypanosomiasis. *Lancet*, 362(9394), 1469-1480.
- Bilska, A. y Wlodek, L. (2005) Lipoic acid - the drug of the future? *Pharmacol Rep*, 57(5), 570-577.
- Bonnet, J., Boudot, C. y Courtioux, B. (2015) Overview of the Diagnostic Methods Used in the Field for Human African Trypanosomiasis: What Could Change in the Next Years? *Biomed Res Int*, 1-10.
- Bringaud, F., Rivière, L. y Coustou, V. (2006) Energy metabolism of trypanosomatids: Adaptation to available carbon sources. *Mol Biochem Parasitol*, 149(1), 1-9.
- Bringaud, F., Barrett, M. P. y Zilberstein, D. (2012) Multiple roles of proline transport and metabolism in trypanosomatids. *Front Biosci*, 17, 349-374.
- Cao, X., y Cronan, J. E. (2015) The *Streptomyces coelicolor* lipoate-protein ligase is a circularly permuted version of the *Escherichia coli* enzyme composed of discrete interacting domains. *J Mol Biol*, 290(11), 7280-7290.
- Cavalier-Smith, T. (2002) The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52(2), 297-354.
- Chen, X. J. (1997) Cloning and characterization of the lipoyl-protein ligase gene LIPB from the yeast *Kluyveromyces lactis*: synergistic respiratory deficiency due to mutations in LIPB and mitochondrial F1-ATPase subunits. *Mol Gen Genet*, 255(3), 341-349.

- Christensen, Q. H. y Cronan, J. E. (2009) The *Thermoplasma acidophilum* LplA-LplB complex defines a new class of bipartite lipoate-protein ligases. *J Biol Chem*, 284(32), 21317-21326.
- Christensen, Q. H. y Cronan, J. E. (2010) Lipoic acid synthesis: A new family of octanoyltransferases generally annotated as lipoate protein ligases. *Biochemistry*, 49(46), 10024-10036.
- Christensen, Q. H., Martin, N., Mansilla, M. C., de Mendoza, D. y Cronan, J. E. (2011) A novel amidotransferase required for lipoic acid cofactor assembly in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 80(2), 350-363.
- Cicchillo, R. M., y Booker, S. J. (2005) Mechanistic investigations of lipoic acid biosynthesis in *Escherichia coli*: both sulfur atoms in lipoic acid are contributed by the same lipoyl synthase polypeptide. *J Am Chem Soc*, 127(9), 2860-2861.
- Claros, M. G. (1995) MitoProt, a Macintosh application for studying mitochondrial proteins. *Comput Appl Biosci*, 11(4), 441-447.
- Crawford, M. J., Thomsen-Zieger, N., Ray, M., Schachtner, J., Roos, D. S. y Seeber, F. (2006) *Toxoplasma gondii* scavenges host-derived lipoic acid despite its *de novo* synthesis in the apicoplast. *EMBO J*, 25(13), 3214-3222.
- Cronan, J. E. (2014) Biotin and lipoic acid: synthesis, attachment and regulation. *EcoSal Plus*, 6(1), 1-39.
- Cronan, J. E. (2016) Assembly of Lipoic Acid on Its Cognate Enzymes: an Extraordinary and Essential Biosynthetic Pathway. *Microbiol Mol Biol R*, 80(2), 429-450.
- Douglas, P., Kriek, M., Bryant, P. y Roach, P. L. (2006) Lipoyl synthase inserts sulfur atoms into an octanoyl substrate in a stepwise manner. *Angew Chem Int Edit*, 45(31), 5197-5199.
- El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A. N., Ghedin, E., Worthey, E. A., Delcher, A. L., Blandin, G., Westenberger, S. J., Caler, E., Cerqueira, G. C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Aslund, L., Attipoe, P., Bontempi, E., Bringaud, F., Burton, P., Cadag, E., Campbell, D. A.,

Carrington, M., Crabtree, J., Darban, H., da Silveira, J. F., de Jong, P., Edwards, K., Englund, P. T., Fazelina, G., Feldblyum, T., Ferella, M., Frasch, A. C., Gull, K., Horn, D., Hou, L., Huang, Y., Kindlund, E., Klingbeil, M., Kluge, S., Koo, H., Lacerda, D., Levin, M. J., Lorenzi, H., Louie, T., Machado, C. R., McCulloch, R., McKenna, A., Mizuno, Y., Mottram, J. C., Nelson, S., Ochaya, S., Osoegawa, K., Pai, G., Parsons, M., Pentony, M., Pettersson, U., Pop, M., Ramirez, J. L., Rinta, J., Robertson, L., Salzberg, S. L., Sanchez, D. O., Seyler, A., Sharma, R., Shetty, J., Simpson, A. J., Sisk, E., Tammi, M. T., Tarleton, R., Teixeira, S., Van Aken, S., Vogt, C., Ward, P. N., Wickstead, B., Wortman, J., White, O., Fraser, C. M., Stuart, K. D. y Andersson, B. (2005) The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of chagas disease. *Science*, 309(5733), 409-415.

Ewald, R., Hoffmann, C., Florian, A., Neuhaus, E., Fernie, A. R. y Bauwe, H. (2014) Lipoate-protein ligase and octanoyltransferase are essential for protein lipoylation in mitochondria of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 165(3), 978-990.

Ewald, R., Hoffmann, C., Neuhaus, E. y Bauwe, H. (2014) Two redundant octanoyltransferases and one obligatory lipoyl synthase provide protein- lipoylation autonomy to plastids of *Arabidopsis*. *Plant Biol*, 16(1), 35-42.

Fairlamb, A. H. (2003) Chemotherapy of human African trypanosomiasis: current and future prospects. *Trends Parasitol*, 19(11), 488-494.

Falkard, B., Kumar, T. R., Hecht, L. S., Matthews, K. A., Henrich, P. P., Gulati, S., Lewis, R. E., Manary, M. J., Winzeler, E. A., Sinnis, P., Prigge, S. T., Heussler, V., Deschermeier, C. y David Fidock (2013) A key role for lipoic acid synthesis during *Plasmodium* liver stage development. *Cel Microbiol*, 15(9), 1585-1604.

Fujiwara, K., Hosaka, H., Matsuda, M., Okamura-Ikeda, K., Motokawa, Y., Suzuki, M., Nakagawa, A. y Taniguchi, H. (2007) Crystal structure of bovine lipoyltransferase in complex with lipoyl-AMP. *J Mol Biol*, 371(1), 222-234.

Fujiwara, K., Maita, N., Hosaka, H., Okamura-Ikeda, K., Nakagawa, A. y Taniguchi, H. (2010) Global conformational change associated with the two-step reaction catalyzed by *Escherichia coli* lipoate-protein ligase A. *J Biol Chem*, 285(13), 9971-9980.

- Goraca, A., Huk-Kolega, H., Piechota, A., Kleniewska, P., Ciejka, E. y Skibska, B. (2011) Lipoic acid - biological activity and therapeutic potential. *Pharmacol Rep*, 63(4), 849-858.
- Green, D. E., Morris, T. W., Green, J., Cronan, J. E. y Guest, J. R. (1995) Purification and properties of the lipoate protein ligase of *Escherichia coli*. *Biochem J*, 309(3), 853-862.
- Griffith, T. W., Carraway, C. A. C., Oh, Y. K. y Leach F. R. (1983) Lipoic Acid Uptake in *Escherichia coli*. *Proc Okla Acad Sci*, 63, 1-8.
- Günther, S., Storm, J. y Müller, S. (2009) *Plasmodium falciparum*: organelle-specific acquisition of lipoic acid. *Int J Biochem Cell Biol*, 41(4), 748-752.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166(4), 557-580.
- Hassan, B. H., y Cronan, J. E. (2011) Protein-protein interactions in assembly of lipoic acid on the 2-oxoacid dehydrogenases of aerobic metabolism. *J Biol Chem*, 286(10), 8263-8276.
- Hermes, F. A. y Cronan, J. E. (2009) Scavenging of cytosolic octanoic acid by mutant LplA lipoate ligases allows growth of *Escherichia coli* strains lacking the LipB octanoyltransferase of lipoic acid synthesis. *J Bacteriol*, 191(22), 6796-6803.
- Hermes, F. A. y Cronan, J. E. (2013) The role of the *Saccharomyces cerevisiae* lipoate protein ligase homologue, Lip3, in lipoic acid synthesis. *Yeast* 30(10), 415-427.
- Hiltunen, J. K., Autio, K. J., Schonauer, M. S., Kursu, V. S., Dieckmann, C. L. y Kastaniotis, A. J. (2010) Mitochondrial fatty acid synthesis and respiration. *BBA-Bioenergetics*, 1797(6), 1195-1202.
- Jackson, A. P. (2015) Genome evolution in trypanosomatid parasites. *Parasitology*, 142(S1), S40-S56.
- Jarrett, J. T. (2014) Biotin synthase: a role for iron-sulfur clusters in the radical-mediated generation of carbon-sulfur bonds. En: *Iron-Sulfur Clusters in Chemistry and Biology*, Ed. Tracey A. Rouault, De Gruyter, Berlín, 107-131.

- Jarrett, J. T. (2015) The biosynthesis of thiol-and thioether-containing cofactors and secondary metabolites catalyzed by radical S-adenosylmethionine enzymes. *J Biol Chem*, 290(7), 3972-3979.
- Jiang, Y. y Cronan, J. E. (2005) Expression cloning and demonstration of *Enterococcus faecalis* lipoamidase (pyruvate dehydrogenase inactivase) as a Ser-Ser-Lys triad amidohydrolase. *J Biol Chem*, 280(3), 2244-2256.
- Jordan, S. W. y Cronan, J. E. (1997) A New Metabolic Link: The acyl carrier protein of lipid synthesis donate lipoic acid to the piruvate dehydrogenase complex in *Escherichia coli* and mitochondria. *J Biol Chem*, 272(29), 17903-17906.
- Jordan, S. W. y Cronan Jr, J. E. (2003). The *Escherichia coli* lipB gene encodes lipoyl (octanoyl)-acyl carrier protein: protein transferase. *J Bacteriol*, 185(5), 1582-1589.
- Kaufman, B. A., Newman, S. M., Hallberg, R. L., Slaughter, C. A., Perlman, P. S. y Butow, R. A. (2000) In organello formaldehyde crosslinking of proteins to mtDNA: identification of bifunctional proteins. *Proc Natl Acad Sci*, 97(14), 7772-7777.
- Kikuchi, G., Motokawa, Y., Yoshida, T., & Hiraga, K. (2008) Glycine cleavage system: reaction mechanism, physiological significance, and hyperglycinemia. *Proc Jpn Acad, Series B*, 84(7), 246-263.
- Kim, K. H., Lee, H. H., Lee, S. J., Ha, J. Y., Yoon, H. J. y Suh, S. W. (2005) Crystal Structure of Lipoate-Protein Ligase A Bound with the Activated Intermediate: INSIGHTS INTO INTERACTION WITH LIPOYL DOMAINS. *J Biol Chem*, 280(45), 38081-38089.
- Krauth-Siegel, R. L. y Schöneck, R. (1995) Flavoprotein structure and mechanism. 5. Trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase as targets for a structure-based drug design. *FASEB J*, 9(12), 1138-1146.
- Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*, 33(7), 1870-1874.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

- Lee, S. H., Stephens, J. y Englund, P. T. (2007) A fatty-acid synthesis mechanism specialized for parasitism. *Nature Rev Microbiol*, 5(4), 287-297.
- Leslie, M. (2011) Drug developers finally take aim at a neglected disease. *Science*, 333(6045), 933-935.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275.
- Lu, W. F., Cao, J. J., Guo, Y. J., Zhong, K., Zha, G. M., Wang, L. F. y Yang, G. Y. (2014) Expression of the porcine lipoic acid synthase (LIAS) gene in *Escherichia coli*. *Genet Mol Res*, 13(3), 5369-5377.
- Ma, Q., Zhao, X., Eddine, A. N., Geerlof, A., Li, X., Cronan, J. E., Kaufmann, S. H. E. y Wilmanns, M. (2006) The *Mycobacterium tuberculosis* LipB enzyme functions as a cysteine/lysine dyad acyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(23), 8662-8667.
- Martin, N., Lombardía, E., Altabe, S. G., de Mendoza, D. y Mansilla, M. C. (2009) A lipA (yutB) mutant, encoding lipoic acid synthase, provides insight into the interplay between branched-chain and unsaturated fatty acid biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 191(24), 7447-7455.
- Martin, N., Christensen, Q. H., Mansilla, M. C., Cronan, J. E. y de Mendoza, D. (2011) A novel two-gene requirement for the octanoyltransfer reaction of *Bacillus subtilis* lipoic acid biosynthesis. *Mol Microbiol*, 80(2), 335-349.
- Marvin, M. E., Williams, P. H. y Cashmore, A. M. (2001) The isolation and characterisation of a *Saccharomyces cerevisiae* gene (*LIP2*) involved in the attachment of lipoic acid groups to mitochondrial enzymes. *FEMS Microbiol Lett*, 199(1), 131-136.
- Matthews, K. R. (2005) The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci*, 118(2), 283-290.
- Mayr, J. A., Feichtinger, R. G., Tort, F., Ribes, A. y Sperl, W. (2014) Lipoic acid biosynthesis defects. *J Inherit Metab Dis*, 37(4), 553-563.
- Miller, J. R., Busby, R. W., Jordan, S. W., Cheek, J., Henshaw, T. F., Ashley, G. W., Broderick, J. B., Cronan, J. E. Jr. y Marletta, M. A. (2000) *Escherichia coli* LipA is a

lipoyl synthase: in vitro biosynthesis of lipoylated pyruvate dehydrogenase complex from octanoyl-acyl carrier protein. *Biochemistry*, 39(49), 15166-15178.

Morris, T. W., Reed, K. E. y Cronan, J. E. (1994) Identification of the gene encoding lipoate-protein ligase A of *Escherichia coli*. Molecular cloning and characterization of the *lplA* gene and gene product. *J Biol Chem*, 269(23), 16091-16100.

Morris, T. W., Reed, K. E. y Cronan, J. E. (1995) Lipoic acid metabolism in *Escherichia coli*: the *lplA* and *lipB* genes define redundant pathways for ligation of lipoyl groups to apoprotein. *J Bacteriol*, 177(1), 1-10.

Mumberg, D., Müller, R., y Funk, M. (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene*, 156(1), 119-122.

Nagarajan, L., y Storms, R. K. (1997) Molecular characterization of GCV3, the *Saccharomyces cerevisiae* gene coding for the glycine cleavage system hydrogen carrier protein. *J Biol Chem*, 272(7), 4444-4450.

Nelson, D., and Cox, M (2005) *The Citric Acid Cycle*. En: Lehninger Principles of Biochemistry, W.H. Freeman and Company, New York, cuarta edición, 601-630.

Ngô, H., Tschudi, C., Gull, K. y Ullu, E. (1998) Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(25), 14687-14692.

Packer, L., Witt, E. H. y Tritschler, H. J. (1995) Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Bio Med*, 19(2), 227-250.

Packer, L., Kraemer, K. y Rimbach, G. (2001) Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition*, 17(10), 888-895.

Packer, L. y Cadenas, E. (2011) Lipoic acid: energy metabolism and redox regulation of transcription and cell signaling. *J Clin Biochem Nutr*, 48(1), 26-32.

Perham, R. N. (1991) Domains, motifs, and linkers in 2-oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes: a paradigm in the design of a multifunctional protein. *Biochemistry*, 30(35), 8501-8512.

Prasad, P. D., Wang, H., Kekuda, R., Fujita, T., Fei, Y. J., Devoe, L. D., Leibach, F. H. y Ganapathy, V. (1998) Cloning and functional expression of a cDNA encoding a

- mammalian sodium-dependent vitamin transporter mediating the uptake of pantothenate, biotin, and lipoate. *J Biol Chem*, 273(13), 7501-7506.
- Ramsby, M. L., y Makowski, G. S. (1999) Differential detergent fractionation of eukaryotic cells. *Methods Mol Biol*, 112, 53-66.
- Reche, P. A. (2000) Lipoylating and biotinylating enzymes contain a homologous catalytic module. *Protein Sci*, 9(10), 1922-1929.
- Rock, C. O. (2009) Opening a new path to lipoic acid. *J Bacteriol*, 191(22), 6782-6784.
- Roldán, A., Comini, M. A., Crispo, M. y Krauth- Siegel, R. L. (2011) Lipoamide dehydrogenase is essential for both bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol*, 81(3), 623-639.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, segunda edición.
- Sato, H., Tachifuji, A., Tamura, M. y Miyakawa, I. (2002) Identification of the YMN-1 antigen protein and biochemical analyses of protein components in the mitochondrial nucleoid fraction of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Protoplasma*, 219(1-2), 51-58.
- Schonauer, M. S., Kastaniotis, A. J., Kursu, V. S., Hiltunen, J. K. y Dieckmann, C. L. (2009) Lipoic acid synthesis and attachment in yeast mitochondria. *J Biol Chem*, 284(35), 23234-23242.
- Shay, K. P., Moreau, R. F., Smith, E. J., Smith, A. R. y Hagen, T. M. (2009) Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta*, 1790(10), 1149–1160.
- Simpson, A. G. B., Stevens, J. R. y Lukes, J. (2006) *Trends Parasitol*, 2(4), 168-174.
- Singh, U. y Jialal, I. (2008) Alpha-lipoic acid supplementation and diabetes. *Nutr Rev*, 66(11), 646-657.
- Soreze, Y., Boutron, A., Habarou, F., Barnerias, C., Nonnenmacher, L., Delpech, H., Mamoune, A., Chrétien, D., Hubert, L., Bole-Feysot, C., Nitschke, P., Correia, I., Sardet, C., Boddaert, N., Hamel, Y., Delahodde, A., Ottolenghi, C., Correia, Sardet, C., Boddaert, N., Hamel, Y., Delahodde, A., Ottolenghi, C. y de Lonlay, P. (2013)

- Mutations in human lipoyltransferase gene LIPT1 cause a Leigh disease with secondary deficiency for pyruvate and alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *Orphanet J Rare Dis*, 8(1), 1-9.
- Souto, R. P., Fernandes, O., Macedo, A. M., Campbell, D. A. y Zingales, B. (1996) DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, 83(2), 141-152.
- Spalding, M. D. y Prigge, S. T. (2009) The amidase domain of lipoamidase specifically inactivates lipoylated proteins in vivo. *PloS one*, 4(10), e7392.
- Spalding, M. D. y Prigge, S. T. (2010) Lipoic acid metabolism in microbial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev*, 74(2), 200-228.
- Stephens, J. L., Lee, S. H., Paul, K. S. y Englund, P. T. (2007) Mitochondrial fatty acid synthesis in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem*, 282(7), 4427-4436.
- Stich, A., Barrett, M. P. y Krishna, S. (2003) Waking up to sleeping sickness. *Trends Parasitol*, 19(5), 195-197.
- Stoffel, S. A., Rodenko, B., Schweingruber, A. M., Mäser, P., de Koning, H. P. y Schweingruber, M. E. (2006) Biosynthesis and uptake of thiamine (vitamin B₁) in bloodstream form *Trypanosoma brucei brucei* and interference of the vitamin with melarsen oxide activity. *Int J Parasitol*, 36(2), 229-236.
- Storm, J. y Müller, S. (2012) Lipoic acid metabolism of *Plasmodium*-a suitable drug target. *Curr Pharm Des*, 18(24), 3480-3489.
- Sulo, P. y Martin, N. C. (1993) Isolation and characterization of LIP5. A lipoate biosynthetic locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 268(23), 17634-17639.
- Suzuki, K., y Reed, L. J. (1963) Lipoamidase. *J Biol Chem*, 238(12), 4021-4025.
- Takaishi, N., Yoshida, K., Satsu, H. y Shimizu, M. (2007) Transepithelial transport of α -lipoic acid across human intestinal Caco-2 cell monolayers. *J Agric Food Chem*, 55(13), 5253-5259.

- Tahara, E. B., Cezário, K., Souza-Pinto, N. C., Barros, M. H. y Kowaltowski, A. J. (2011) Respiratory and TCA cycle activities affect *S. cerevisiae* lifespan, response to caloric restriction and mtDNA stability. *J Bioenerg Biomembr*, 43(5), 483-491.
- Towbin, M., Staehelin, T., y Gordon, J. (1979) Western blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate--polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibodies and radio-iodinated protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76, 43-50.
- Turcotte, B., Liang, X. B., Robert, F. y Soontorngun, N. (2009) Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast. *FEMS Yeast Res*, 10(1), 2-13.
- Tyler, K. M., Matthews, K. R. y Gull, K. (1997) The bloodstream differentiation--division of *Trypanosoma brucei* studied using mitochondrial markers. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 264(1387), 1481-1490.
- Tyler, K. M. y Engman, D. M. (2001) The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol*, 31(5), 472-481.
- Urbina, J. A. y Docampo, R. (2003) Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol*, 19(11), 495-501.
- Uttaro, A. D. (2014) Acquisition and biosynthesis of saturated and unsaturated fatty acids by trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol*, 196(1), 61-70.
- Voorheis, H. P. (1980) Fatty acid uptake by bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* and other species of the kinetoplastida. *Mol Biochem Parasitol*, 1(3), 177-186.
- Wada, M., Yasuno, R., Jordan, S. W., Cronan Jr, J. E. y Wada, H. (2001) Lipoic acid metabolism in *Arabidopsis thaliana*: cloning and characterization of a cDNA encoding lipoyltransferase. *Plant Cell Physiol*, 42(6), 650-656.
- Wang, S. C. y Frey, P. A. (2007) S-adenosylmethionine as an oxidant: the radical SAM superfamily. *Trends Biochem Sci*, 32(3), 101-110.

- Wang, M., Motafakkerazad, R., Matsugo, S., Wada, N. y Konishi, T. (2011) Activity assay of Lipoamidase, an expected modulator of metabolic fate of externally administered lipoic acid. *Inflamm Regen*, 31(1), 88-94.
- Wilkinson, S. R. y Kelly, J. M. (2009) Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Expert Rev Mol Med*, 11, e31, 1-24.
- Wrenger, C. y Müller, S. (2004) The human malaria parasite *Plasmodium falciparum* has distinct organelle- specific lipoylation pathways. *Mol Microbiol*, 53(1), 103-113.
- Yasuno, R. y Wada, H. (1998) Biosynthesis of lipoic acid in *Arabidopsis*: cloning and characterization of the cDNA for lipoic acid synthase. *Plant Physiol*, 118(3), 935-943.
- Yi, X. y Maeda, N. (2005). Endogenous production of lipoic acid is essential for mouse development. *Mol Cell Biol*, 25(18), 8387-8392.
- Zhao, X., Miller, J. R. y Cronan, J. E. (2005) The reaction of LipB, the octanoyl-[acyl carrier protein]: protein N-octanoyltransferase of lipoic acid synthesis, proceeds through an acyl-enzyme intermediate. *Biochemistry*, 44(50), 16737-16746.
- Zingales, B., Souto, R. P., Mangia, R. H., Lisboa, C. V., Campbell, D. A., Coura, J. R., Jansen, A. y Fernandes, O. (1998) Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int J Parasitol*, 28(1), 105-112.